

**Untersuchung zur Vorhersagbarkeit
des Therapieansprechens unter
anti-TNF-Therapie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von:

Maria Brigitte Klingner, geb. Siegemund

Geburtsdatum / Geburtsort:

26.07.1985 / Karl-Marx-Stadt, jetzt Chemnitz

angefertigt:

an der Universität Leipzig, Department für Innere Medizin, Sektion Rheumatologie

Betreuer:

Prof. Dr. med. Ulf Wagner und Dr. rer. nat. Undine Meusch

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 17.06.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Die rheumatoide Arthritis	1
1.1.1 Epidemiologie und Klinik	1
1.1.2 Diagnosekriterien	1
1.1.3 Beurteilung von Krankheitsaktivität und Therapieansprechen	2
1.1.4 Ätiologie und Pathogenese	5
1.1.5 Therapie	6
1.2 Der Tumornekrosefaktor	10
1.2.1 Aufbau von TNF	10
1.2.2 Reverse Signaling von tmTNF und Vordaten	11
1.3 Ziele und Fragestellungen	13
2 Patienten und Methoden	14
2.1 Studiendesign	14
2.2 Patientenauswahl	14
2.3 Behandlungsplan	15
2.3.1 Blutentnahmen	16
2.4 Beurteilung der Krankheitsaktivität	16
2.4.1 Gelenkuntersuchungen und <i>Disease Activity Score</i>	16
2.4.2 Einschätzung durch den Patienten (VAS)	16
2.4.3 Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit und C-reaktives Protein	16
2.5 Beurteilung des Therapieansprechens	17
2.6 Materialien	18
2.7 Methoden	21
2.7.1 Separation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation	21
2.7.2 Isolation von Monozyten mittels Magnetseparation	21
2.7.3 Bestimmung der Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie ...	22
2.7.4 Monozytenkultur und Stimulation der Zellen mit Etanercept	23
2.7.5 Quantifizierung der Apoptose mittels Durchflusszytometrie	23
2.8 Statistische Auswertung	24

3 Ergebnisse	25
3.1 Allgemeine Angaben zum Patientenkollektiv und klinische Ergebnisse	25
3.1.1 Deskriptive Statistik der Patientenkohorte	25
3.1.2 Nebenwirkungen	27
3.1.3 Verlauf der Therapie	27
3.1.4 Therapieansprechen	28
3.2 Ergebnisse aus zellbiologischen Experimenten	29
3.2.1 Expression von membranständigem TNF, TNFR1 und TNFR2 auf der Zelloberfläche von RA-Monozyten zu Studienbeginn	29
3.2.2 Untersuchung der Spontanapoptose und der Reverse Signaling induzierten Apoptose von RA-Monozyten zu Studienbeginn	31
3.3. Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Klinik, Therapie und experimentell erhobenen Parametern	36
3.3.1 Zusammenhang von Krankheitsaktivität und experimentellen Parametern zu Studienbeginn	36
3.3.2 Einfluss der Etanercept-Therapie auf den Verlauf der Apoptose	37
3.3.3 Einfluss der Etanercept-Therapie auf den Expressionsverlauf von tmTNF sowie TNFR1 und TNFR2	44
3.3.4 Möglichkeiten der Vorhersage des Therapieansprechens mit Hilfe experimenteller Parameter	47
4 Diskussion	57
4.1 Patientenkollektiv, Studiendesign und Ansprechen	57
4.2 Therapieansprechen der Patienten	59
4.3 Expression von tmTNF sowie TNFR1 und TNFR2 auf RA-Monozyten	60
4.4 Spontanapoptose und RS induzierte Apoptose der RA-Monozyten	60
4.5 Zusammenhang zwischen Krankheitsaktivität und experimentellen Parametern zu Studienbeginn	61
4.6 Verlauf der experimentellen Parameter unter Therapie	62
4.7 Vorhersage des Therapieansprechens mit Hilfe der Spontanapoptose und der RS induzierten Apoptose	64
4.8 Ausblick	67
5 Zusammenfassung	68
6 Literaturverzeichnis	71

7 Abbildungsverzeichnis	81
8 Tabellen- und Formelverzeichnis	83
9 Eigenständigkeitserklärung	84
10 Lebenslauf	85
11 Danksagung	87

Bibliographische Beschreibung

Klingner, Maria Brigitte

Untersuchung zur Vorhersagbarkeit des Therapieansprechens unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Universität Leipzig, Dissertation

87 S., 105 Lit., 30 Abb., 13 Tab., 1 Formel

Referat:

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische Autoimmunerkrankung, bei der eine persistierende Entzündung der Gelenkinnenhaut zu Gelenkschmerzen und zu Funktionsverlust durch Knorpel- und Knochendestruktionen führt. Im Zentrum der Pathogenese stehen proinflammatorische Zytokine, insbesondere das vorrangig durch Monozyten produzierte Zytokin Tumornekrosefaktor (TNF). TNF stimuliert die Produktion weiterer proinflammatorischer Botenstoffe und hält das Entzündungsgeschehen aufrecht. Zudem wurde bereits festgestellt, dass membranständiger TNF (tmTNF) in weiteren komplexen Immunprozessen bei der RA involviert ist. Eine anti-TNF-Therapie erreicht bei zwei Drittel der Patienten ein gutes Ansprechen und eine Reduktion der Krankheitsaktivität. Es ist jedoch bekannt, dass circa 30% der RA-Patienten nicht von der Therapie profitieren. Das stellt sowohl klinisch als auch gesundheitsökonomisch ein Problem dar. Das Therapieansprechen kann jedoch bisher nicht vorhergesagt werden. Das Ziel dieser Studie war, einen prädiktiven Marker für das Ansprechen auf anti-TNF-Therapie zu finden. Dazu wurde bei Patienten mit RA eine Therapie mit dem TNF-Antagonist Etanercept initiiert. Das Therapieansprechen wurde dokumentiert und die Blutmonozyten der RA-Patienten wurden laborchemisch hinsichtlich verschiedener Oberflächenmarker, Spontanapoptose und Apoptose nach Inkubation mit Etanercept untersucht. Es zeigte sich die Tendenz, dass diejenigen RA-Patienten, deren Monozyten initial eine höhere Spontanapoptose zeigten, besser auf eine Therapie mit Etanercept ansprachen. Die Ergebnisse wurden mit der vorhandenen Literatur verglichen und diskutiert.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
A	Österreich
Abb.	Abbildung
ACR	American College of Rheumatology
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
Ak	Antikörper
AMG	Arzneimittelgesetz
ANA	Antinukleärer Antikörper
APC	Allophycocyanin
BL	Baseline
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
CCP	cyclische citrullinierte Peptide
CD	cluster of differentiation
CH	Schweiz
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
D	Deutschland
DAS28	Disease Activity Score (mit 28 Gelenken)
DMARD	Disease-modifying anti-rheumatic drugs
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETA	Etanercept
EULAR	European League Against Rheumatism
Fab	Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers
FACS	fluorescence activated cell sorter
Fc	kristallisierbares Fragment eines Antikörpers
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FSC	foreward scatter

g	Fallbeschleunigung
GB	Großbritannien
h	Stunde
HAQ	Health Assessment Questionnaire
HLA	human leukocyte antigen
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL	Interleukin
IP	Interphalangeal
kDa	Kilodalton
KH-Akt.	Krankheitsaktivität
LPS	Lipopolysaccharid
Max	Maximalwert
MCP	Metakarpophalangealgelenke
MHC	mean histocompatibility complex
min	Minute
Min	Minimalwert
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
Mst	Morgensteifigkeit
MTP	Metatarsophalangealgelenke
MTX	Methotrexat
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
oGC	orale Glukokortikoidtherapie
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PIP	proximale Interphalangealgelenke
RA	Rheumatoide Arthritis
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
RF	Rheumafaktor

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RS	Reverse Signaling
RSIA	Reverse Signaling induzierte Apoptose
SD	Standardabweichung
SEM	standard error mean
SJC	swollen joint count
SpA	Spontanapoptose (Apoptose der Monozyten in Kultur)
SSC	side scatter
Tab.	Tabelle
TACE	TNF α converting enzyme
TJC	tender joint count
tmTNF	transmembraner TNF
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
USA	United States of America
VAS	visuelle Analogskala
vs.	versus

1 Einleitung

1.1 Die Rheumatoide Arthritis

1.1.1 Epidemiologie und Klinik

Die häufigste Erkrankung des rheumatischen Formenkreises ist die Rheumatoide Arthritis (RA). Sie ist außerdem eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen des Menschen mit einer Prävalenz von bis zu 1%. Frauen sind gegenüber Männern häufiger betroffen. Das typische Alter des Krankheitsbeginns liegt zwischen 55 und 75 Jahren [1].

Klinisch zeigt sich die chronisch-entzündliche Erkrankung zu Beginn mit Schmerzen und Schwellung verschiedener Gelenke, die vor allem morgens eine Steifigkeit zeigen. Die Patienten leiden häufig zusätzlich unter Allgemeinsymptomen, wie Müdigkeit und Abgeschlagenheit [2]. Im weiteren Verlauf kommt es zu fortschreitender erosiver Gelenkdestruktion und daraus resultierender Deformation der Gelenke.

Hauptsächlich handelt es sich um eine symmetrische Polyarthritiden der kleinen Finger- und Fußgelenke. Dabei sind die proximalen Interphalangealgelenke (proximale IP, PIP), die Metakarpophalangeal- (MCP) und die Metatarsophalangeal- (MTP) Gelenke am häufigsten beteiligt. Mittelgroße Gelenke wie Hand-, Ellenbogen- und Sprunggelenke sind ebenfalls regelmäßig betroffen, eine Mon- oder Oligoarthritiden der großen Gelenke ist seltener.

Die Rheumatoide Arthritis ist jedoch nicht nur auf die Gelenke beschränkt. Extraartikuläre Beteiligungen und systemische Organmanifestation kommen bei circa 47% der Fälle vor und betreffen an erster Stelle das kardiovaskuläre System [3]. So kann die RA zum Beispiel für Perikarditiden oder thromboembolische Ereignisse, insbesondere Myokardinfarkt und Apoplex, ursächlich sein. Weiterhin sind Vaskulitiden an Augen, Schleimhäuten oder Lunge bekannt. Diese schweren systemischen Verläufe können lebensbedrohliche Folgen haben und erklären die erhöhte Mortalität bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis [4].

1.1.2 Diagnosekriterien

Um eine rechtzeitige Therapie der RA einzuleiten, ist es wichtig zuvor eine zielführende und konkrete Diagnostik durchzuführen. Die *European League Against Rheumatism* (EULAR) und das *American College of Rheumatology* (ACR) beschäftigen sich seit Jahren mit der klinischen Einteilung und der Aufstellung von Diagnosekriterien für die Rheumatoide Arthritis. Die neuesten Klassifikationskriterien zur Diagnosestellung der RA stammen aus dem Jahr 2010 und wurden in Zusammenarbeit von ACR und EULAR erarbeitet [5] (Tab.1).

Tabelle 1: Die ACR/EULAR-Klassifikationskriterien für die Diagnose der Rheumatoiden Arthritis von 2010.

Gelenkbeteiligung = Druckschmerzhaftigkeit oder Schwellung; Große Gelenke: Schulter, Ellenbogen, Hüfte, Knie, Sprunggelenk; Kleine Gelenke: Handgelenke, zweites bis fünftes Metakarpophalangealgelenke, prox. Interphalangealgelenke, zweites bis fünftes Metatarsophalangealgelenk, Interphalangealgelenke der Zehen; Anti-CCP-Ak = Antikörper gegen cyclische citrullinierte Peptide; BSG = Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit; Niedrig-positiv = ≤ 3 -fach erhöht.

Gelenkbeteiligung	Score
1 großes Gelenk	0
2 – 10 große Gelenke	1
1 -3 kleine Gelenke	2
4 – 10 kleine Gelenke	3
> 10 Gelenke (mindestens ein kleines Gelenk)	5
Serologie	
Negative Rheumafaktoren oder negative anti-CCP-Ak	0
Niedrig-positive Rheumafaktoren oder niedrig-positive anti-CCP-Ak	2
Hoch-positive Rheumafaktoren oder hoch-positive anti-CCP-Ak	3
Entzündungsparameter	
Normales C-reaktives Protein und normale BSG	0
Abnormales C-reaktives Protein oder abnormale BSG	1
Dauer der Symptome	
< 6 Wochen	0
≥ 6 Wochen	1

Voraussetzung für die genaue Untersuchung der Patienten nach diesem Schema ist mindestens ein geschwollenes Gelenk, welches nicht durch eine andere Krankheit erklärt werden kann. Ausgeschlossen werden das erste MCP-, das erste MTP- und die distalen IP-Gelenke, da diese Gelenkbeteiligungen häufig arthrotische Ursachen haben. Gelenke, an denen Verletzungen bekannt sind, sollten ebenfalls aus der Bewertung genommen werden.

Die jeweiligen Werte der Bereiche Gelenkbeteiligung, Serologie, Entzündungsparameter und Dauer der Symptome werden addiert. Die erhobene Zahl liegt zwischen 0 und 10. Eine sichere Diagnose kann bei einem Wert von ≥ 6 gestellt werden.

1.1.3 Beurteilung von Krankheitsaktivität und Therapieansprechen

Es ist von großer klinischer Bedeutung die Anzahl der geschwollenen und druckschmerzhaften Gelenke zu kennen, um die Krankheitsaktivität zu beurteilen. Scott et al. zeigten, dass diese Zahlen direkt mit der Krankheitsaktivität verbunden sind [6]. Der 66/68-Gelenkbogen des *American College of Rheumatology* ist der ausführlichste Gelenkbogen und beinhaltet nahezu alle tastbaren Gelenke [7]. Das Hüftgelenk wird nur bei den druckschmerzhaften und nicht bei den geschwollenen Gelenken gezählt, daher kommt es zu der Bezeichnung 66/68-Gelenkscore. Fuchs et al. entwickelten 1989 eine reduzierte Variante

der Gelenkuntersuchung mit den 28 meistbetroffenen Gelenken unter Betonung der oberen Extremitäten [8]. Dazu gehören beide Schultergelenke, beide Ellenbogengelenke, beide Handgelenke, fünf Fingergrundgelenke beidseits, fünf Fingermittelgelenke und beide Kniegelenke. Vergleichsstudien haben gezeigt, dass die Angaben der 66/68er- und der reduzierten 28er-Methode korrelieren [9, 10]. Daher wird aktuell die 28-Gelenkuntersuchung präferiert. Abbildung 1 zeigt ein „Gelenkmännchen“ mit allen tastbaren Gelenken und Rot markiert sind die Gelenke der reduzierten 28-Gelenk-Methode.

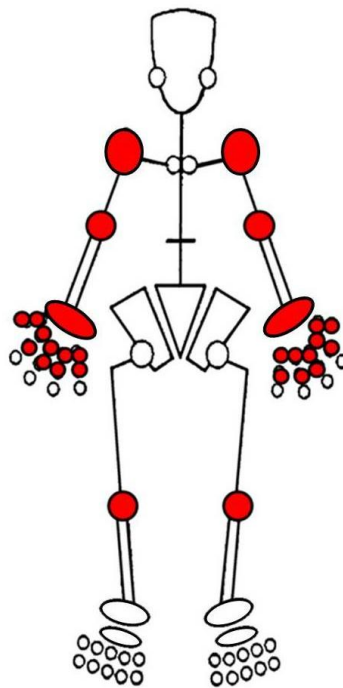


Abbildung 1: Gelenkmännchen mit Darstellung der zu untersuchenden Gelenke. Alle runden oder ovalen Strukturen stellen Gelenke dar. Es ist der 66/68-Gelenkbogen abgebildet, in Rot sind die Gelenke der reduzierten 28-Gelenk-Methode markiert.

Um weitere klinische Parameter in die Beurteilung der Krankheitsaktivität einzubeziehen, wurde 1990 von van der Heijde et al. eine Klassifikation entwickelt, die als *Disease Activity Score* (DAS) bezeichnet wird [11]. In den DAS fließen

- die Anzahl der schmerzhaften und geschwollenen Gelenke,
- die Einschätzung der Krankheitsaktivität durch den Patienten auf einer visuellen Analogskala (VAS) und
- die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) als Entzündungsparameter ein.

Damit gibt der DAS eine Aussage über die aktuelle Schwere der Erkrankung. Eine vereinfachte Version ist der DAS28, bei dem die 28 meistbetroffenen Gelenke in die Berechnung eingehen [12].

Der DAS28 berechnet sich nach folgender Formel:

Formel 1: Berechnung des DAS28, modifiziert nach [12]

$$\text{DAS28} = 0.56 * \sqrt{\text{TJC } 28} + 0.28 * \sqrt{\text{SJC } 28} + 0.70 * \ln \text{BSG} + 0.014 * \text{VAS}$$

TJC 28 = Anzahl der druckschmerzhaften Gelenke von 28

SJC 28 = Anzahl der geschwollenen Gelenke von 28

BSG = Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit

VAS = Einschätzung der Krankheitsaktivität durch den Patienten

Das Ergebnis ist eine dimensionslose Zahl und kann Werte zwischen 0 und 10 annehmen. Dabei gilt ein Wert von 0 bis 3,2 als niedrige Krankheitsaktivität und Werte zwischen 3,2 und 5,1 als mittlere Aktivität der Rheumatoiden Arthritis. Alle DAS28-Werte von über 5,1 stehen für eine hohe Krankheitsaktivität.

Neben der Krankheitsaktivität, ist das Therapieansprechen ein wichtiger klinischer Marker. Es gibt verschiedene Methoden, um das Therapieansprechen zu beurteilen. Das ACR und die EULAR haben Kriterien hierfür entwickelt und unterschiedliche Parameter einbezogen.

Die ACR-Response-Kriterien sind seit 1981 bekannt und beinhalten folgende Werte:

1. Anzahl der schmerzhaften Gelenke
2. Anzahl der geschwollenen Gelenke
3. Gesamtbeurteilung der Krankheitsaktivität durch den Arzt
4. Gesamtbeurteilung der Krankheitsaktivität durch den Patienten
5. Angabe des Schmerzes durch den Patienten
6. *Health Assessment Questionnaire* (HAQ, ein Fragebogen zur Erfassung der Behinderung durch die RA)
7. C-reaktives Protein (Entzündungsparameter)

Das Therapieansprechen wird dabei nach 20%- (ACR20), 50%- (ACR50), 70%- (ACR70) und 90%-Verbesserung (ACR90) gestuft. Für eine messbare Verbesserung von beispielsweise 20% (ACR20) müssen die Anzahl der schmerzhaften und geschwollenen Gelenke (Parameter 1.+2.) sowie mindestens drei der verbliebenen fünf Parameter um 20% sinken [13].

Ende der 1990er Jahre wurden die EULAR-Response-Kriterien entwickelt [14]. Sowohl die Änderung des DAS28, als auch der aktuelle DAS28 unter Therapie fließen in die Beurteilung ein. Das Therapieansprechen wird dabei in die Kategorien gutes, mittleres und kein Ansprechen eingeteilt (Tab.2).

Tabelle 2: EULAR-Response-Kriterien

DAS28 aktuell	DAS28-Änderung		
	>1,2	>0,6 und ≤1,2	≤0,6
≤3,2	gut	mittel	kein
>3,2 und ≤5,1	mittel	mittel	kein
>5,1	mittel	kein	kein

1.1.4 Ätiologie und Pathogenese

Die genaue Ursache der Entstehung einer Rheumatoiden Arthritis ist ungeklärt. Aus Zwillingsstudien ist bekannt, dass es eine genetische Prädisposition für die Ausprägung und Schwere der RA gibt [15, 16]. Verschiedene Allele des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) auf Chromosom 6 stehen dabei im Fokus der Forschung. Es wurde gezeigt, dass bestimmte HLA-Allele (*human leukocyte antigens*) des MHC-Klasse II-Komplexes (HLA-DR1, HLA-DR4 u.a.) mit der Rheumatoiden Arthritis assoziiert sind [17, 18]. Strukturelle Ähnlichkeiten in den Aminosäuresequenzen des HLA-DRB1-Gens werden seit 1987 *shared epitope* genannt und sind bei 80 bis 90% der RA-Patienten zu finden [19]. Träger dieser Allele haben ein erhöhtes Risiko für Rheumatoide Arthritis [1]. Insgesamt kann man den Einfluss genetischer Faktoren auf die Ätiologie der Erkrankung mit ca. 60% quantifizieren [16].

Neben der genetischen Disposition spielen Umweltfaktoren, Rauchen und möglicherweise Erreger bzw. Infektionen eine Rolle bei der Entstehung der Rheumatoiden Arthritis [20, 21].

Wie bereits aus den ACR-Kriterien von 2010 bekannt ist, stehen die Rheumafaktoren und anti-CCP-Antikörper im Mittelpunkt der Labordiagnostik und sind Beispiele für Autoantikörper bei der Rheumatoiden Arthritis [22]. Rheumafaktoren (RF) wurden erstmals 1940 von Waaler entdeckt und sind Antikörper, die gegen das kristalline Fragment (Fc-Teil) von Immunglobulin G (IgG) gerichtet sind. Rheumafaktoren sind auch bei anderen Autoimmunerkrankungen zu finden und somit relativ unspezifisch für die Rheumatoide Arthritis [23]. Mit der Entdeckung der anti-CCP-Antikörper Ende der 90er Jahre wurde ein wichtiges Instrument in der Diagnostik der RA gefunden. Diese Autoantikörper sind gegen Proteine gerichtet, die nach posttranslationaler Modifikation die Aminosäure Citrullin anstatt

Arginin besitzen [24]. Sie zeigen eine hohe Spezifität und geben einen Hinweis auf Schwere und Prognose der Erkrankung [23].

Die zelluläre Infiltration und die damit einhergehende erhebliche Verbreiterung der Gelenkinnenhaut, auch Synovitis genannt, ist das zentrale Geschehen in der Immunpathogenese der RA [25]. Zu Beginn steht die Aktivierung der mononukleären und makrophagenähnlichen Typ-A Synoviozyten, die nach Präsentation eines noch unbekannten Antigens T- und B-Lymphozyten aktivieren. In der Folge einer erhöhten Gefäßpermeabilität und Expression von Adhäsionsmolekülen wandern verschiedene Zelltypen in die Synovialmembran ein. Diese Ansammlung wird als Pannus bezeichnet und wirkt bereits knorpel- und knochendestruktiv. Eine vermehrte Zytokinproduktion aller Zelltypen hält das Entzündungsgeschehen aufrecht [26]. Dabei ist die monozytäre Produktion von Tumornekrosefaktor (TNF) von wesentlicher Bedeutung und vielseitiger Wirkung. Neben der autokrinen Funktion und damit einer Selbstaktivierung der Monozyten, regt TNF die Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin -1, -6, und -8 an [27]. Weiterhin führt TNF zur Proliferation von Fibroblasten, die destruktive Enzyme und Prostaglandin E2 sezernieren und damit aktiv zur Zerstörung von Gelenkstrukturen führen [28]. Die Aktivierung von Chondrozyten und Osteoklasten verstärkt den Angriff auf Knochen und Knorpel [29, 30]. Chu et al. erbrachten 1991 den Nachweis von Tumornekrosefaktor in entzündetem Synovialgewebe von RA-Patienten [31].

Die zentrale Rolle von TNF in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis wird im Abschnitt 1.2 näher erläutert.

1.1.5 Therapie

Patienten mit Rheumatoider Arthritis erleiden im Laufe der Erkrankung Gelenkdeformitäten oder extraartikuläre Manifestationen. Daher ist die Remission das oberste Ziel der Therapie. Ein früher und effizienter Therapiebeginn ist ein bedeutsamer Faktor in der Krankheitsbehandlung, da so eine Remission besser erreicht werden kann [32]. Neben der medikamentösen Therapie gibt es eine Reihe wichtiger konservativer Verfahren, die die Erkrankung beeinflussen können und das Leiden der Patienten erträglicher machen. Physiotherapie, Ergotherapie, spezielle Hilfsmittel für den Alltag und Patientenschulungen sind nur einige Beispiele.

Da es sich bei der RA um eine teils sehr aggressive Autoimmunerkrankung handelt, ist eine medikamentöse Therapie mit spezifischen Präparaten unentbehrlich.

NSAR und Glukokortikoide

Klassische Medikamente mit entzündungshemmender und analgetischer Komponente sind nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR), wie Diclofenac oder Ibuprofen, die über die Hemmung der Cyclooxygenase (COX) zur Reduktion inflammatorischer Prostaglandine führen.

Eine systemische antiphlogistische und teilweise immunsuppressive Wirkung haben steroidale Antiphlogistika, also Glukokortikoide, die über eine Hemmung der Phospholipase A2 und Verminderung der Arachidonsäure die Produktion von Leukotrienen und Prostaglandinen senken. Die immunsuppressive Wirkweise kommt auch durch Zytokinhemmung und verminderte Lymphozytenaktivität zustande [33].

Diese Medikamente stehen für kurzfristige Therapieanpassung und Immunsuppression zur Verfügung.

Klassische DMARDs

Disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) wurden nach ihrer Entwicklung zu einer Standardtherapie der Rheumatoiden Arthritis. Als Basistherapie werden sie zügig im Krankheitsverlauf eingesetzt und modifizieren die Erkrankung langfristig. Wichtige Vertreter sind Methotrexat (MTX), Leflunomid, Azathioprin, Sulfasalazin und Antimalariamittel, wie Chloroquin. Goldverbindungen werden kaum noch eingesetzt. MTX, erstmals in den 1950er Jahren eingesetzt, greift in höherer Dosierung als Folsäureantagonist in die DNS-Synthese proliferativer Zellen ein. In der immunsuppressiven Therapie entzündlich-rheumatologischer Erkrankungen beruht sein krankheitsmodulierender Effekt auf der Freisetzung von Adenosin, welches antiinflammatorisch wirksame Adenosinrezeptoren stimuliert [34]. Durch guten Therapieerfolg wurde es zum Goldstandard der Therapie der Rheumatoiden Arthritis [35].

Im Jahr 2010 hat die *European League Against Rheumatism* neue Therapieleitlinien für die Rheumatoide Arthritis herausgegeben [36]. Einige Auszüge dieser Richtlinien sind hier dargestellt.

- Eine Therapie mit DMARDs sollte so früh wie möglich begonnen werden.
- MTX sollte Teil dieser frühen Therapie sein.
- Eine DMARD-Monotherapie ist einer Kombinationstherapie vorzuziehen.
- Glukokortikoide können zu DMARDs kombiniert werden, sollten jedoch zügig reduziert werden.
- Wenn das Therapieziel mit dieser Strategie nicht erreicht wurde, sind biologische DMARDs bei Vorhandensein schlechter Prognosefaktoren einzusetzen.

Biologische DMARDs

Die zentrale Rolle von Zytokinen und Zellinteraktionen in der Pathogenese der RA führte zur Entwicklung von *biologicals*. Diese hochspezifischen Medikamente sind gegen biologische Botenstoffe, wie Zytokine oder Zytokinrezeptoren gerichtet. Den biologischen DMARDs ist gemein, dass sie die Wirkung proinflammatorischer Zytokine, wie TNF und IL-1 hemmen [37]. Wichtige Vertreter sind die TNF-Inhibitoren.

TNF-Inhibitoren

Im Jahr 1993 veröffentlichte die Gruppe um Feldmann und Miani eine klinische Studie, bei der 20 Patienten mit aktiver Rheumatoider Arthritis mit einem chimären monoklonalen anti-TNF-Antikörper behandelt wurden [38]. Die Therapie wurde gut vertragen und es zeigte sich eine starke Reduktion der klinischen Aktivität. Seitdem sind neue anti-TNF-Substanzen hinzugekommen, welche die Therapie der Rheumatoiden Arthritis revolutionierten.

Aktuell sind fünf TNF-Inhibitoren (Infliximab, Adalimumab, Etanercept, Certolizumab, Golimumab) zugelassen, die verschiedenartige Strukturen und unterschiedliche Wirkmechanismen aufweisen. Die Gemeinsamkeit ist jedoch die Bindung an TNF und dessen Wirkungshemmung [39]. Infliximab, Adalimumab und Golimumab sind monoklonale Antikörper, wobei das antigen-bindende Fragment (*Antigen-binding fragment*, Fab) bei Infliximab von der Maus stammt (chimär) und bei Adalimumab sowie Golimumab human ist. Bei Certolizumab ist das Fab-Fragment an Polyethylenglycol gebunden, um so länger im Körper verfügbar zu sein.

Etanercept (ETA) hingegen ist ein humanes Rezeptor-Fc-Fusionsprotein, bei dem zwei TNF-Bindungsstellen des TNF-Rezeptor 2 (TNFR2) an das kristallisierbare Fragment (*crystallisable fragment*, Fc) eines Antikörpers gekoppelt sind.

Die Wirkung der TNF-Inhibitoren ist in erster Linie die Bindung und Hemmung des löslichen Tumornekrosefaktors. Der Faktor kann nicht mehr an die Rezeptoren binden und damit keine proinflammatorischen Signale auslösen. Die konkreten Effekte der TNF-Blockade sind jedoch unklar [40]. Eine reduzierte Zellzahl und eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen im Synovialgewebe könnte ein Ansatzpunkt sein [41]. Luger et al. zeigten, dass Infliximab bei Monozyten von Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung Apoptose auslöst [42]. Außerdem wurde beobachtet, dass die Synthese der Zytokine TNF, IL-1 α und -1 β nach anti-TNF-Therapie verringert ist [43].

Die TNF-Inhibitoren sind hochwirksam und erzielten in verschiedenen klinischen Studien, auch in Kombination mit synthetischen DMARDs, ein gutes Ergebnis [44, 45]. Insgesamt stellte sich auch die Verträglichkeit der Therapien gut dar. In Übersichtsarbeiten wurde das

Risiko für Infektionen und Tumore unter anti-TNF-Therapie untersucht [46, 47]. Es ist bekannt, dass es eine erhöhte Rate für Infekte und das Risiko für den Ausbruch latenter Tuberkulose gibt. Daher muss das Nutzen-Risiko-Verhältnis, gerade bei Risikopatienten mit z. Bsp. Tumor oder Hepatitis in der Anamnese abgewogen werden.

Ein weiterer kritischer Fakt der Therapie, neben hohen Jahrestherapiekosten im fünfstelligen Bereich, ist das Nicht-Ansprechen bei circa 30% der Patienten [48].

Diese Patienten werden nicht ausreichend behandelt und leiden länger unter den Symptomen der Erkrankung, während diese möglicherweise aggressiv fortschreitet. Weiterhin erhalten diese Patienten eine Therapie, die unter Umständen mit schweren Nebenwirkungen einher geht. Das sind Risiken, die man vermeiden sollte. Außerdem stellen die unnötig ausgegebenen Therapiekosten eine starke gesundheitsökonomische Belastung dar.

Es ist daher von großem klinischem und wirtschaftlichem Interesse, das Therapieansprechen auf eine anti-TNF-Therapie vorherzusagen. Wichtig ist dabei, dass die Vorhersage bereits in einem frühen Stadium der Erkrankung bzw. vor Beginn der Therapie möglich wird.

Bisherige Versuche das anti-TNF-Therapieansprechen bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis vorherzusagen, bezogen sich auf ausgewählte Biomarker oder klinische Parameter. Chara et al. zeigten, dass Unterschiede in der Expression der drei Monozytensubpopulationen bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis mit dem Ansprechen auf Adalimumab zusammenhängen. Dafür nutzen sie Daten nach drei Monaten Therapie und konnten das Ansprechen nach sechs Monaten vorhersagen [49]. Desweiteren konnte in Vollblutkulturen von RA-Patienten gezeigt werden, dass eine niedrigere IL-1 β -Produktion vor allem bei schlechtem Therapieansprechen auftritt [50]. Mit Hilfe des Biologika-Registers der Britischen Gesellschaft für Rheumatologie wurden 2006 über 2800 Patienten hinsichtlich klinischer Parameter, Vortherapien und Risikofaktoren ausgewertet [51]. Es ließ sich beispielsweise erkennen, dass eine höhere Krankheitsaktivität vor Therapie mit einem schlechteren Therapieansprechen einhergeht. Dagegen zeigten Patienten mit bisheriger NSAR- und MTX-Therapie ein besseres Ansprechen. Dies war jedoch nur für ein anti-TNF-Therapeutikum signifikant.

Die Suche nach Markern für die Vorhersage des Therapieansprechens wird sehr forciert. Es konnte jedoch bisher kein aussagekräftiger und praktisch einsetzbarer Faktor gefunden werden [52].

Für die Prädiktion des anti-TNF-Therapieansprechens ist es essenziell die Wirkungsweise der Therapie zu verstehen. Daher ist es wichtig, genaue Kenntnis über das Zielmolekül, den Tumornekrosefaktor, zu haben.

1.2 Der Tumornekrosefaktor

William B. Coley, ein amerikanischer Chirurg und Krebsforscher, fand Ende des 19. Jahrhunderts heraus, dass sich Tumore nach Streptokokkeninfektionen zurückbildeten [53]. Es wurde vermutet, dass ein körpereigener Stoff für den Untergang des Tumors verantwortlich war. Ein zytotoxisches, von Lymphozyten produziertes Protein wurde 1968 von Kolb et al. entdeckt und Lymphotoxin (LT) genannt [54]. Im Jahr 1975 wurde ein Faktor im Serum von Mäusen gefunden, die mit *Bacillus Calmette-Guérin* infiziert waren. Dieser Faktor löste Nekrose bei verschiedenen Tumorzellen aus und wurde daraufhin als Tumornekrosefaktor (TNF) bezeichnet [55]. Die genetische Struktur wurde 1984 entschlüsselt und die strukturelle sowie funktionelle Ähnlichkeit von TNF und LT führte zu Umbenennung in TNF-alpha und -beta [56]. Seither ist bekannt geworden, dass TNF hauptsächlich von Monozyten oder Makrophagen produziert wird und in löslicher Form eine zentrale Rolle in der Vermittlung von entzündlichen Prozessen spielt [57, 58, 59, 60].

1.2.1 Aufbau von TNF

Der Tumornekrosefaktor wird zunächst als 26kDa große Vorstufe (Pro-TNF) in der Zelle translatiert und als Typ II-Membranprotein in die Zellmembran eingebaut [61]. Strukturanalysen haben gezeigt, dass die membranständige Proform als Homotrimer vorkommt [62]. Eine eigene, zytotoxische Aktivität der transmembranen Proform (tmTNF) konnte gezeigt werden und ist Gegenstand aktueller Forschung [63, 64, 65].

Die lösliche Form (sTNF) wird mittels TACE (*TNF-alpha Converting Enzyme*), einem Enzym der ADAM- (*a disintegrin and metalloproteinase*) Familie von Pro-TNF abgespalten [66]. Der biologisch aktive, lösliche Tumornekrosefaktor setzt sich aus drei Monomeren (je 17kDa) zu einem 51kDa großen Molekül zusammen.

Weitere Untersuchungen zu TNF ergaben, dass dieser Faktor zu einer Familie gehört, die TNF-Superfamilie genannt wird und transmembrane Proteine mit Strukturhomologien zusammenfasst [67]. Beispiele für weitere Mitglieder neben TNF-alpha und -beta sind CD27-Ligand, CD40-Ligand, CD95-Ligand, Fas-Ligand, RANKL und TRAIL. Die Vertreter der TNF-Superfamilie binden an spezifische Rezeptoren, die in der TNF-Rezeptor-Superfamilie gruppiert werden. Die Liganden können an mehrere Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie binden und somit unterschiedliche Effekte in der Zelle auslösen. Der zytoplasmatische Teil der Rezeptoren ist dabei von großem Interesse und enthält beispielsweise die Todes-Domäne, über die der programmierte Zelltod ausgelöst werden kann. Der TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) enthält eine solche Domäne [68, 69].

Neben dem TNFR1, der 55-60kDa groß ist und auf nahezu allen Körperzellen vorkommt, kann TNF auch an TNF-Rezeptor 2 (TNFR2), einen 75-80kDa großen Rezeptor der TNF-Rezeptor-Superfamilie, binden. TNF vermittelt seine komplexe Wirkung hauptsächlich über TNFR1. Der genaue Wirkmechanismus über TNFR2, der vornehmlich von Zellen des Immunsystems exprimiert wird, ist noch unbekannt. Grell et al. zeigten beispielsweise, dass die Wirkung von tmTNF verstärkt über TNFR2 vermittelt wird [70].

Es wurde bereits erwähnt, dass zusätzlich zur Wirkung des löslichen Tumornekrosefaktors auch die Funktion der membranständigen Form eine Rolle in der Signalkaskade von TNF spielt. Dabei kann tmTNF als Ligand an TNF-Rezeptoren binden und Signale in die Zelle vermitteln. Ein weiterer, als Reverse Signaling bezeichneter Effekt ist die Funktion von tmTNF als Rezeptor.

1.2.2 Reverse Signaling von tmTNF und Vordaten

Die Fähigkeit membrangebundener Liganden Signale in die Zelle zu vermitteln, ist schon von mehreren Zytokinen der TNF-Superfamilie, wie Fas-Ligand [71] oder CD30-Ligand [72] bekannt. Reverse Signaling von tmTNF wurde ebenfalls mehrfach untersucht [65, 73, 74, 75]. Die Interaktion kann dabei zwischen tmTNF und anti-TNF-Antikörpern oder Etanercept (TNFR2-Fc-Fusionsprotein) stattfinden. Außerdem kann Reverse Signaling in direktem Zell-Zell-Kontakt über TNF-Rezeptoren induziert werden (Abb.2).

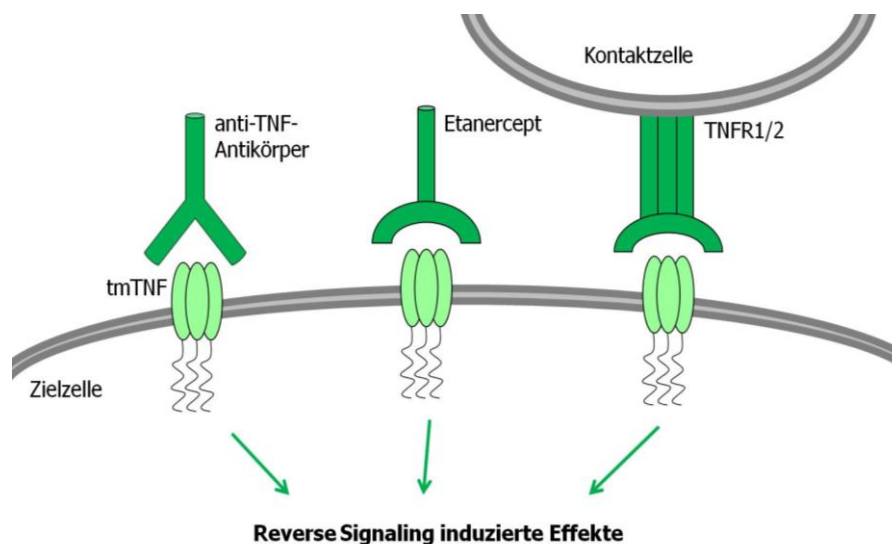


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Reverse Signaling. Transmembraner TNF (tmTNF) interagiert mit anti-TNF-Antikörpern, Etanercept (einem TNFR2-Fc-Fusionsprotein) und über Zell-Zell-Kontakt mit gebundenen TNF-Rezeptoren und löst Reverse Signaling induzierte Effekte in der Zielzelle aus.

Der konkrete Effekt in der Zelle ist sehr vielschichtig und noch nicht ausreichend erforscht. Eissner et al. zeigten beispielsweise, dass nach Inkubation von Monozyten mit monoklonalen TNF-Antikörpern oder löslichen TNF-Rezeptoren via tmTNF die Produktion von apoptoseauslösenden Faktoren der Monozyten reduziert war. Ebenso wurde die LPS-induzierte Zytokinproduktion (TNF, IL-1, IL-10) gehemmt [73]. Für die zugrunde liegende Signaltransduktion wurde Reverse Signaling identifiziert.

Auch Vordaten unserer Arbeitsgruppe zeigten wegweisende Ergebnisse. Es wurde beobachtet, dass unter anti-TNF-Therapie die TNF-Produktion von RA-Monozyten nach Co-Kultur mit aktivierten T-Zellen herabgesetzt ist. Die Interaktion zwischen aktivierten T-Zellen und Monozyten geschieht zum einen über tmTNF auf T-Zellen via TNFR1/2 auf Monozyten. Zum Zweiten ist eine Wechselwirkung über tmTNF auf Monozyten und TNFR2 auf aktivierten T-Zellen, also Reverse Signaling, denkbar. Die Reduktion der TNF-Produktion unter anti-TNF-Therapie konnte nur auf die Blockade des tmTNF der Monozyten durch Reverse Signaling zurückgeführt werden [65].

Wie bereits erwähnt, ist die anti-TNF-Therapie zu einem unverzichtbaren Bestandteil in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis geworden. So ist in diesem Zusammenhang von großem Interesse, welchen Einfluss eine anti-TNF-Therapie auf Monozyten und das Reverse Signaling bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis hat. Andererseits ist es denkbar, dass Reverse Signaling ein weiterer Effekt der anti-TNF-Therapie ist und dieser über die Apoptose der Monozyten wirksam wird [40, 42, 76].

Diesem Thema widmeten sich auch unsere Arbeitsgruppe und die vorliegende Studie. Meusch et al. zeigten zunächst, dass Monozyten von RA-Patienten signifikant mehr tmTNF exprimieren als gesunde Kontrollen. Desweiteren konnte die erhöhte IL1 β -Spontanproduktion von RA-Monozyten durch Infliximab via tmTNF Reverse Signaling gehemmt werden. Die Spontanapoptose von RA-Monozyten war gegenüber Monozyten von gesunden Kontrollen vermindert. Nach Zugabe des anti-TNF-Antikörpers Infliximab wurde eine erhöhte Apoptoserate bei RA-Monozyten, nicht aber bei gesunden Monozyten gemessen. Diese Apoptoseinduktion korreliert mit der tmTNF-Expression und ist sehr wahrscheinlich eine Konsequenz des Reverse Signaling via tmTNF auf RA-Monozyten [75].

Die Apoptoserate der RA-Monozyten nach anti-TNF-Stimulation war gegenüber gesunden Monozyten stark erhöht. Die Ursache dafür könnte eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Monozyten gegenüber Reverse Signaling induzierter Apoptose sein.

Dabei ist denkbar, dass eine niedrige Sensitivität der Monozyten für Reverse Signaling induzierte Apoptose (RSIA) der Grund für schlechtes Ansprechen auf anti-TNF-Therapie bei RA-Patienten ist.

1.3 Ziele und Fragestellungen

Ziel der Studie war es, einen prädiktiven Marker für das Ansprechen auf anti-TNF-Therapie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis zu finden. Dabei wurde vor allem die Bedeutung des Reverse Signaling von membranständigem TNF auf RA-Monozyten für die Vorhersage des anti-TNF-Therapieansprechens untersucht.

Es wurden folgende Fragestellungen erarbeitet.

1. In welcher Höhe exprimieren die Monozyten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis membranständigen TNF (tmTNF) bzw. TNFR1 und TNFR2?
2. Wie stellt sich die Spontanapoptose von RA-Monozyten in Kultur dar?
3. Kann Reverse Signaling induzierte Apoptose durch Etanercept via tmTNF in RA-Monozyten ausgelöst werden? Ist diese Apoptose unterschiedlich stark ausgeprägt?
4. Welchen Einfluss hat eine anti-TNF-Therapie mit Etanercept auf die Expression von tmTNF, TNFR1 und TNFR2 auf RA-Monozyten?
5. Wie sprechen Patienten mit Rheumatoider Arthritis auf eine anti-TNF-Therapie mit Etanercept an? Wie ist der Therapieverlauf?
6. Welche Bedeutung hat die Reverse Signaling induzierte Apoptose für das Therapieansprechen?
7. Gibt es einen prädiktiven Marker, der das Therapieansprechen auf Etanercept vor Therapiebeginn vorhersagen kann?

2 Patienten und Methoden

2.1 Studiendesign

Im Zeitraum von März 2011 bis Juni 2012 wurden 20 Patienten am Universitätsklinikum Leipzig, Department für Innere Medizin, Sektion Rheumatologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ulf Wagner in der Studie betreut. Die Rekrutierung der Patienten erfolgte über eine niedergelassene Rheumatologin oder über klinikinterne Zuweisung von Station oder Ambulanz.

Es handelt sich um eine klinische, nicht interventionelle, nicht placebo-kontrollierte, prospektive und monozentrische Beobachtungsstudie.

2.2 Patientenauswahl

In die Studie wurden Patienten mit Rheumatoider Arthritis aufgenommen, für die eine Indikation zur anti-TNF-Therapie bestand. Für die Teilnahme an der Studie wurden folgende Einschlusskriterien festgelegt.

- Patienten älter als 18 Jahre
- Patienten mit Rheumatoider Arthritis entsprechend den neuen ACR/EULAR Kriterien von 2010 (Tab.1)
- bestehende Indikation für eine anti-TNF-Therapie nach den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie
- Patienten ohne bisherige anti-TNF-Therapie

Es wurden nachstehende Ausschlusskriterien angewendet.

- Patientinnen in Schwangerschaft oder Stillzeit
- Patienten mit aktiven malignen Erkrankungen oder anderen Kontraindikationen für eine anti-TNF-Therapie
- Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen außer der RA
- Patienten, die bereits mit einem anti-TNF-Antagonist behandelt wurden

Die Patienten erklärten vor jeglicher Studienhandlung nach ausführlicher Aufklärung und Bedenkzeit schriftlich ihr Einverständnis und unterzeichneten eine entsprechende Erklärung.

Im Sinne des AMG §40 gilt die hier beschriebene Studie nicht als medizinische Prüfung von Arzneimitteln, da das eingesetzte Medikament zugelassen ist und die Untersuchungen nicht

der Indikationserweiterung dienen. Eine Einreichung bei der Ethikkommission oder der Bundesoberbehörde war daher nicht verpflichtend.

2.3 Behandlungsplan

Nach Einstellung auf Etanercept wurden die Patienten unter Therapie regelmäßig untersucht. Insgesamt wurde die anti-TNF-Therapie 24 Wochen beobachtet.

Entsprechend den Empfehlungen des Paul-Ehrlich-Instituts wurden die Patienten vor Einstellung routinemäßig auf latente Tuberkulose getestet. Bei positivem Befund musste gemäß den Leitlinien eine 9-monatige Therapie mit Isoniazid als Prophylaxe durchgeführt werden. Die Behandlung mit dem anti-TNF-Inhibitor konnte mit einem Monat Verzögerung begonnen werden.

Zum zeitlichen Ablauf der Studie gibt Abbildung 3 eine Übersicht. Zu Studienbeginn wurde die erste Visite, die Baseline Visite (BL) durchgeführt. Nach Therapiebeginn wurden die Patienten bis Woche 16 alle 4 Wochen und zuletzt nach 24 Wochen zu Follow-up Visiten einbestellt.

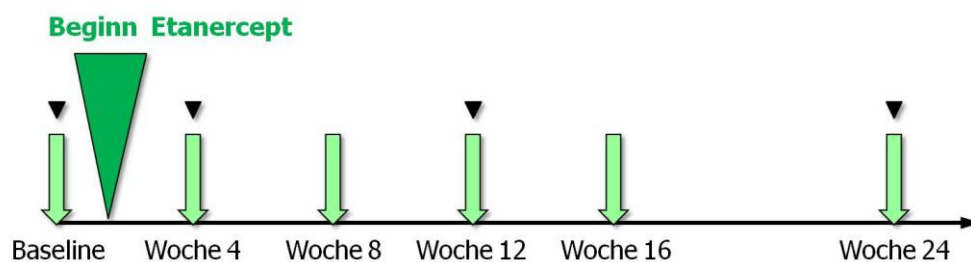


Abbildung 3: Studienplan zum Ablauf der Studie. Die Pfeile markieren die Visiten, das große Dreieck zeigt den Beginn der Etanercept-Therapie an. Die Patienten wurden vor Therapiebeginn einmal, dann alle 4 Wochen bis Woche 16 und zuletzt zu Woche 24 einbestellt und untersucht. Eigene Laborexperimente (schwarzes Dreieck) wurden zu Baseline, Woche 4, 12 und 24 durchgeführt.

Zu jeder Visite erfolgte eine ausführliche Erhebung der Anamnese und eine klinische Untersuchung. Um die Krankheitsaktivität einzuschätzen, wurden die Gelenke der Betroffenen anhand eines Gelenkbogens analysiert. Die Dauer der Morgensteifigkeit wurde dokumentiert und die Patienten wurden gebeten die visuelle Analogskala zur Einschätzung der Krankheitsaktivität auszufüllen. Zudem wurden zu jeder Visite Blutentnahmen durchgeführt. Das Blut wurde einerseits laborchemischen Routineuntersuchungen und andererseits eigenen Laborexperimenten zugeführt. Diese experimentellen Parameter wurden zu Baseline und zu Woche 4, 12 und 24 erhoben.

Alle zur Baseline Visite erhobenen klinischen und experimentellen Daten stellen Basiswerte dar, auf die sich die weiteren Werte beziehen.

2.3.1 Blutentnahmen

Die Blutentnahmen erfolgten bei jedem Patienten einmal vor Einstellung auf Etanercept und unter Therapie zu jeder Follow-up Visite. Bei jeder Blutentnahme wurde maximal 50 ml venöses Blut aus einer Ellenbeugenvene in EDTA- oder Serummonovetten entnommen. Das entnommene Blut wurde oben genannten Untersuchungen zugeführt.

2.4 Beurteilung der Krankheitsaktivität

2.4.1 Gelenkuntersuchungen und *Disease Activity Score*

Für die Beurteilung der Krankheitsaktivität wurde die Anzahl der druckschmerzhaften und geschwollenen Gelenke bestimmt. Dazu wurden die unter Punkt 1.1.3 angegeben 28 Gelenke der RA-Patienten hinsichtlich Druckschmerz positiv bzw. negativ bewertet. Um die Gelenkschwellung zu validieren, wurden die Gelenke mit beiden Händen und entsprechender klinischer Erfahrung untersucht.

Aus beiden Zahlen wurde der *Disease Activity Score* (DAS28) ermittelt. Der DAS28 ist eine dimensionslose Zahl und das Ergebnis mehrerer klinischer Parameter, die ein Maß für die aktuelle Schwere der Erkrankung eines Patienten sind. In die Berechnung flossen die Anzahl der schmerzhaften und geschwollenen Gelenke, die Einschätzung der Krankheitsaktivität durch den Patienten auf einer visuellen Analogskala (VAS) und die BSG als Entzündungsparameter ein (Formel 1).

2.4.2 Einschätzung durch den Patienten (VAS)

Die Beurteilung der Aktivität der Rheumatoiden Arthritis fließt auch in die Berechnung des DAS28 ein. Sie wird auf einer visuellen Analogskala (VAS), die von 0 bis 100 Millimeter reicht, von den Patienten mit einem senkrechten Strich auf einer horizontalen Linie angegeben.

2.4.3 Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit und C-reaktives Protein

Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) oder auch Blutsenkungsreaktion ist eine Untersuchungsmethode zur Feststellung von entzündlichen Erkrankungen. Zugrunde liegt die Sedimentation der Erythrozyten und anderer zellulärer Bestandteile des Blutes im weniger dichten Plasma. Nach der Westergren-Methode von 1924 wird noch heute gemessen. Aus einer Vene entnommenes Vollblut wird mit einer gerinnungshemmenden Natriumcitratlösung

vermischt und in ein 200mm langes Kunststoffröhrchen aufgenommen. Nach einer Stunde wird anhand der Millimetermarkierung die Höhe der erythrozytenfreien Plasmasäule und damit der BSG-Wert in mm/h abgelesen.

Die Blutsenkungsreaktion ist abhängig von Art und Anzahl der Plasmaproteine als auch der Blutzellen insgesamt. So ruft zum Beispiel eine Entzündungsreaktion mit erhöhter Zahl an Akut-Phase-Proteinen wie Fibrinogen durch verstärkte Vernetzung der Erythrozyten eine Beschleunigung der BSG hervor. Normwerte liegen bei Frauen bis 20mm/h und bei Männern bis 15mm/h [77].

Die Bestimmung des C-reaktiven Proteins (CRP) ist ein weiteres Verfahren um die entzündliche Aktivität der Rheumatoiden Arthritis zu bewerten. In der klinischen Diagnostik wird es eingesetzt, um entzündliche oder neoplastische Erkrankungen zu untersuchen. Das Protein kann an das C-Polysaccharid der Zellwand von Streptokokken binden und wurde daher C-reaktives Protein genannt. Es gehört zu den Akut-Phase-Proteinen und wird in der Leber nach Stimulation gebildet. Zu diesen Stimulanzen gehören viele Zytokine, vor allem IL-6. Das C-reaktive Protein bindet an Polysaccharide verschiedener Erreger oder an Zellmembranen toter und sterbender Körperzellen und aktiviert das Komplementsystem. Damit ist CRP Teil des unspezifischen Immunsystems.

Eine Analyse des CRP erfolgt im Serum oder Plasma. Konzentrationen über 10mg/l gelten als erhöht [77].

2.5 Beurteilung des Therapieansprechens

Das Therapieansprechen wurde in der Studie anhand der EULAR-Response-Kriterien eingeteilt. Dabei erfolgt die Einteilung nach den Kategorien gutes, mittleres und kein Ansprechen (Tab.2)

Zur feineren Beurteilung wurden zusätzlich die Veränderung des DAS28 und die Veränderung der Einzelparameter

- Anzahl der geschwollenen Gelenke
- Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
- C-reaktives Protein
- Einschätzung der Krankheitsaktivität durch den Patient (VAS)
- Dauer der Morgensteifigkeit

gewertet.

2.6 Materialien

Laborgeräte

Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Gefriertruhe -20°C	Liebherr, Biberach an der Riss, D
Gefriertruhe -80°C	Hettich, Tuttlingen, D
Inkubator	Binder, Tuttlingen, D
Kühlschrank Liebherr premium	Liebherr, Biberach an der Riss, D
MACS-Zellseparation	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Mikroskop Axiostar	Carl Zeiss, Jena, D
Pipetten	Labsystems GmbH, Frankfurt a.M., D
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Sterilbank Herasafe KS	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Vortexer	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Zählkammer nach Neubauer	Paul Marienfeld, Lauda Königshofen, D
Zentrifuge Eppendorf 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifuge Hettich Rotina 46 RS	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifuge Megafuge 1.0 RS	Kendro Laboratory Products, Langenselbold, D

Verbrauchsmaterialien

FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
MACS-Zellseparationssäulen	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Monovetten (Serum, EDTA)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Pasteurpipette	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Pipetten (10ml, 25ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, A
Reaktionsgefäße (1,5ml; 0,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Zellkulturplatten (24-well, 96-well)	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, A

Chemikalien und Zellkulturmedien

Annexin V APC	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, D

Ficoll-Paque™ Plus	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
Formaldehydlösung (37%ig)	Merck, Darmstadt, D
Fötales Kälberserum (FKS)	Life Technologies Gibco, Carlsbad, USA
Hepes	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Humanes AB-Serum	freiwillige, gesunde Spender
Monocyte Isolation Kit II (MACS)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Natriumazid (10%ig)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Propidiumiodid	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI)	Life Technologies Gibco, Carlsbad, USA
Türk's Reagenz	Merck, Darmstadt, D

AB-Medium 10%

- RPMI-Medium mit 10% humanem AB-Serum

Separationsmedium

- PBS mit 10% FKS und 2mM EDTA

Puffer und Lösungen

Annexin-Bindungspuffer

- 150mM NaCl
- 2mM CaCl₂
- 10mM Hepes
- Der Puffer wird in 1l Aqua dest. hergestellt.

FACS-Waschpuffer

- PBS mit 2% fetalem Kälberserum und 0,1% Natriumazid

FACS-Fixierpuffer

- PBS mit 3% Formaldehydlösung

PBS/EDTA

- PBS mit 0,3 mM EDTA für Dichtegradientenzentrifugation
- PBS mit 1 mM EDTA für Apoptoseassay

FACS-Blockpuffer

- 1mg/ml Immunglobulin G in FACS-Waschpuffer

Antikörper

- Etanercept 50mg/ml (Enbrel®) (Wyeth, Madison, USA)
- Rituximab 2mg/ml (MabThera®) (F. Hoffmann-La Roche, Basel, CH)

Antikörper gegen	Fluorochrome	Hersteller
IgG1	PE	R&D Systems, Minneapolis, USA
IgG1	FITC	R&D Systems, Minneapolis, USA
IgG2	FITC	R&D Systems, Minneapolis, USA
tmTNF	FITC	Hycult Biotech Inc., Plymouth Meeting, USA
TNFR1	PE	R&D Systems, Minneapolis, USA
TNFR2	FITC	R&D Systems, Minneapolis, USA

Software

CellQuest

Flowjo

GraphPad Prism 5.02

2.7 Methoden

2.7.1 Separation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) mittels

Dichtegradientenzentrifugation

Um periphere mononukleäre Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) aus dem Vollblut der Patienten zu separieren, bedient man sich der Dichtegradientenzentrifugation. Grundlage dieses Verfahrens ist die unterschiedliche Dichte von Monozyten, Lymphozyten, Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten. Mittels Ficoll, einem Polymer aus Saccharose, werden die Zellen entsprechend ihrer Dichte unter Zentrifugation voneinander getrennt. Dabei sinken die Erythrozyten und Granulozyten nach unten, darüber befindet sich das Ficoll mit einer geringeren Dichte. Über dieser Phase lagern sich die mononukleären Zellen als dünne Interphaseschicht ab. Darüber liegt die Plasmaschicht mit Thrombozyten.

Das Vollblut der Patienten wurde 3:1 mit PBS/0,3 mM EDTA verdünnt und zu je 30ml auf 10ml Ficoll überschichtet. Nach 25 minütiger Zentrifugation (25°C, 700g, ohne Bremse) wurde die Interphaseschicht mit einer Eppendorf-Pipette vorsichtig abgenommen. Anschließend wurden die Zellen in ein neues Röhrchen überführt und 10 Minuten mit 50ml kaltem PBS/EDTA (0,3mM) bei 500g und 4°C gewaschen. Danach wurde der Waschschrift wiederholt, in dem der Überstand verworfen und das Zellpellet erneut mit 4°C kaltem PBS/EDTA (0,3mM) resuspendiert wurde. Diesmal erfolgte die Zentrifugation bei 430g und 4°C. Nach diesem Schritt wurden 10µl der Zellsuspension mit 10µl Türks-Reagenz gefärbt und die Zellzahl in der Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Parallel wurde die Zellsuspension ein drittes Mal bei 430g und 4°C 10 Minuten gewaschen und anschließend der Monozytenseparation zugeführt.

2.7.2 Isolation von Monozyten mittels Magnetseparation

Die Isolierung der Monozyten aus den PBMCs erfolgt mittels Trennung der Zellen entsprechend ihrer Oberflächenantigene. Monozyten tragen auf ihrer Zellmembran das Oberflächenantigen CD14 und sind damit von den anderen mononukleären Zellen zu trennen. In den durchgeführten Experimenten erfolgte die Monozytengewinnung mit Hilfe magnetischer CD14-negativ-Separation. Dabei werden nur die CD14-negativen Zellen mit Biotin-gelabelten Antikörpern markiert. Nach Zugabe von anti-Biotin-Antikörpern, welche an magnetische Mikrobeads gekoppelt sind, wird die Zellsuspension durch eine Magnetsäule geleitet. Dabei bleiben die markierten, CD14-negativen Zellen in der Säule hängen und die CD14-positiven Monozyten werden in einem Röhrchen unter der Säule aufgefangen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die gewünschten Zellen unstimuliert bleiben.

Für die korrekte Durchführung wurden je 10 Mio. PBMCs mit 30µl Separationsmedium, 10µl FcR-Blocking Reagenz und 10µl Biotin-Antikörper-Mix 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln gefärbt. Danach wurden erneut 30µl Separationsmedium und 20µl anti-Biotin-Mikrobeads pro 10 Mio. Zellen zugegeben und die PBMCs für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrift (430g, 10 min, 4°C) wurde das Zellpellet in zunächst 1ml Separationsmedium resuspendiert und über eine Magnetsäule gegeben, die zuvor mit Separationsmedium aktiviert wurde. Insgesamt wurde die Säule mit 10ml Separationsmedium nachgespült. Die Monozyten wurden in einem 15ml Röhrchen aufgefangen und nach Färbung mit Türks-Reagenz unter dem Mikroskop gezählt.

2.7.3 Bestimmung der Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie

Zur Untersuchung ihrer Oberflächenmoleküle wurden die isolierten Monozyten mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert. Diese binden an für sie spezifische Antigene auf der Zelloberfläche. Im Durchflusszytometer werden die Zellen einzeln und in hoher Geschwindigkeit durch einen Laserstrahl geleitet. So wird jede Zelle einzeln gemessen. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch den Laser angeregt und emittieren ein Licht bestimmter Wellenlänge. Desweiteren geben die Form und die Größe der Zellen unterschiedliches Streulicht ab. Das Vorwärtstreulicht (*foreward scatter*, FSC) gibt Informationen über die Größe der Zelle, während das Seitwärtstreulicht (*side scatter*, SSC) Aussagen zur Granularität der Zelle liefert. Die Lichtemission wird von einem Detektor gemessen. Die verschiedenen Zellpopulationen werden elektronisch eingegrenzt und können so getrennt untersucht werden [78].

Für einen FACS-Ansatz wurden je 2×10^5 der separierten Monozyten mit 50µl FACS-Blockpuffer resuspendiert, um unspezifische Bindung der Antikörper an den Fc-Rezeptoren der Monozyten zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen mit PE- bzw. FITC-markierten Antikörpern für 30 Minuten im Dunkeln bei 2-8°C inkubiert. Danach wurden die Proben 10 Minuten bei 4°C mit je 1ml FACS-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Nach Zugabe von je 200µl FACS-Puffer und 200µl Fixierpuffer wurden die Proben entweder sofort am Durchflusszytometer gemessen oder bei 2-8°C im Dunkeln aufbewahrt und am nächsten Tag gemessen.

2.7.4 Monozytenkultur und Stimulation der Zellen mit Etanercept

Die Monozyten wurden mit dem anti-TNF-Fusionsprotein Etanercept bzw. mit einer Isotypkontrolle inkubiert. Da Etanercept den Fc-Teil des IgG1-Antikörpers trägt und Monozyten viele Fc-Rezeptoren besitzen, ist eine unspezifische Bindung nicht auszuschließen. Um diese zu quantifizieren, ist es nötig eine Isotypkontrolle einzusetzen. Dazu wurde der anti-CD20-Antikörper Rituximab verwendet, der ebenfalls ein IgG1-Grundbestandteil besitzt. Monozyten tragen kein CD20 auf ihrer Oberfläche und können Rituximab nur unspezifisch über ihre Fc-Rezeptoren binden. Der Kulturansatz erfolgte mit einer Zelldichte von 2×10^5 bzw. 1×10^6 Monozyten pro Well einer 96- bzw. 24-Wellplatte. Als Zellkulturmedium wurde RPMI mit 10% humanem AB-Serum eingesetzt. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 40 µg/ml zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 16 Stunden bei 37°C und 5% CO₂. Danach wurde der Zellkulturüberstand gewonnen und bei -80°C aufbewahrt. Die Monozyten wurden nach Kultur in einem Apoptoseassay weiter untersucht (siehe 2.7.5.).

2.7.5 Quantifizierung der Apoptose mittels Durchflusszytometrie

Um die Apoptose der Zellen zu untersuchen, wurde ein Apoptoseassay mit Annexin V und Propidiumiodid durchgeführt. Das Prinzip beruht darauf, dass sich während des programmierten Zelltods, der Apoptose, Änderungen in der Zellmembran ergeben. So wechselt zum Beispiel das Phospholipid Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran und kann dort von Annexin V gebunden werden. Um die apoptotischen von den nekrotischen Zellen zu unterscheiden wird Propidiumiodid hinzugegeben. Dieser Fluoreszenzfarbstoff kann nur bei Nekrose durch die permeable Zellmembran eindringen und mit der DNS interkalieren [79].

Die Zellen wurden mit APC-markiertem Annexin V und Propidiumiodid gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch gemessen. Zur Quantifizierung der Apoptose wurde der prozentuale Anteil der Annexin V-positiven apoptotischen Zellen erhoben. Für die Analyse der Spontanapoptose wurden die Ansätze nach Inkubation mit Rituximab genutzt. Die anti-TNF-induzierte Apoptose wurde nach Zugabe des anti-TNF-Fusionsproteins Etanercept bestimmt. Die Zellen wurden nach Kultivierung für 20 Minuten mit PBS/1mM EDTA bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um die adhärenenten Monozyten aus dem Well zu lösen. Anschließend wurden die Zellen für acht Minuten bei 500g und 4°C gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen in 50 µl Annexin-Mix (1 µl APC-markiertem Annexin V, 1 µl Propidiumiodid und 48 µl Annexin-Bindungspuffer) resuspendiert und für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben sofort im Durchflusszytometer gemessen.

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit der Software GraphPad Prism 5.02 durchgeführt. Mit Hilfe deskriptiver Statistik wurde die Charakteristik der Patientenkohorte aufgezeigt. Die Angaben erfolgen als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) oder standard error mean (SEM) bzw. als Median mit Minimal (Min)- und Maximalwert (Max). Zur Überprüfung von signifikanten Unterschieden zwischen abhängigen Variablen wurde der gepaarte t-Test für parametrische und der Wilcoxon-Rangsummentest für nicht-parametrische Verteilung durchgeführt. Für die Analyse von unabhängigen Variablen kam der ungepaarte t-Test für parametrische Verteilung zur Anwendung. Der Mann-Whitney-U-Test wurde für unabhängige, nicht-parametrische Variablen eingesetzt. Außerdem wurden Korrelationsanalysen von zwei Datenreihen mit Pearson-Test für parametrische und Spearman-Test für nicht-parametrische Verteilung durchgeführt. Für alle Untersuchungen wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit mit $p \leq 0,05$ angegeben. Der p-Wert wurde entweder genau oder mit * angegeben. Dabei wurde ein $p < 0,01$ mit ** und ein $p < 0,001$ mit *** gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Angaben zum Patientenkollektiv und klinische Ergebnisse

Im Untersuchungszeitraum wurden 27 Patienten für die Studie ausgewählt. Bei 7 Patienten wurden die Ein- und Ausschlusskriterien, die unter 2.2 erläutert sind, nicht vollständig erfüllt. Insgesamt wurden 20 Patienten in die Studie eingeschlossen und für die Auswertung herangezogen.

3.1.1 Deskriptive Statistik der Patientenkohorte

Eine Zusammenfassung der Patientencharakterisierung ist in Tabelle 3 gezeigt. Unter den Patienten waren 6 Männer (30%) und 14 Frauen (70%). Das mediane Alter zu Studienbeginn lag bei 54 Jahren. Die jüngste Patientin war 29 Jahre, die Älteste 66 Jahre alt. Die Krankheitsdauer der Rheumatoiden Arthritis im Patientenkollektiv betrug im Median 3 Jahre und reichte von ein bis dreizehn Jahren.

Um die Erkrankung und ihre Schwere einordnen zu können, wurden mehrere Faktoren gemessen und bestimmt. Diese sind im Folgenden dargestellt.

Die durchschnittliche Angabe auf der visuellen Analogskala zur Beurteilung der Krankheitsaktivität durch den Patienten zu Studienbeginn lag bei $47,75 \pm 20,43\text{mm}$ (Median 47,5mm) und reichte von 4mm bis 87mm. Die Morgensteifigkeit der Gelenke dauerte im Mittel $55 \pm 52,34$ Minuten (0-180min, Median 30min). Bei allen Patienten wurde die Anzahl der druckschmerzhaften und geschwollenen Gelenke bestimmt. Diese lag im Schnitt bei $8,25 \pm 7,28$ (0-25, Median 6) druckschmerzhaften und $5,45 \pm 3,72$ (0-14, Median 4,5) geschwollenen Gelenken. Zur Einschätzung der Krankheitsaktivität wurden außerdem die Entzündungsparameter C-reaktives Protein (CRP) und die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) bestimmt. Das CRP betrug zu Studienbeginn im Mittel $7,22 \pm 6,51\text{mg/l}$ (0,3 - 21,14mg/l, Median 4,4mg/l) und die BSG lag durchschnittlich bei $23,35 \pm 13,85\text{mm/h}$ (3 - 62mm/h, Median 22mm/h). Der DAS28 wurde mit der BSG berechnet, betrug im Durchschnitt $4,76 \pm 1,17$ zu Studienbeginn und reichte von 2,65 bis 6,86 (Median 5,02). Positive Rheumafaktoren waren bei 13 Patienten (65%) zu finden, 16 Patienten (80%) hatten positive anti-CCP-Antikörper.

Tabelle 3: Deskriptive Statistik des Patientenkollektivs (n=20). Dargestellt ist die absolute Anzahl bzw. der Prozentsatz in Klammern oder der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung der gemessenen oder bestimmten klinischen Parameter. DAS28 = *Disease Activity Score* mit 28 Gelenken; VAS = visuelle Analogskala zur Beurteilung der Krankheitsaktivität durch den Patienten; BSG = Blutsenkungsgeschwindigkeit; CCP = cyclisches citrulliniertes Peptid; DMARD = *disease-modifying anti-rheumatic drugs*.

Parameter		Patientenkohorte
Geschlecht n (%)	weiblich	14 (70)
	männlich	6 (30)
Alter in Jahren (MW \pm SD)		53 \pm 9
Dauer RA in Jahren (MW \pm SD)		4 \pm 4
VAS in mm (MW \pm SD)		47,75 \pm 20,43
Morgensteifigkeit in Minuten (MW \pm SD)		55 \pm 52,34
druckschmerzhaft Gelenke (MW \pm SD)		8,25 \pm 7,28
geschwollene Gelenke (MW \pm SD)		5,45 \pm 3,72
C-reaktives Protein in mg/l (MW \pm SD)		7,22 \pm 6,51
BSG in mmHg/h (MW \pm SD)		23,35 \pm 13,85
DAS28 (MW \pm SD)		4,76 \pm 1,17
Rheumafaktoren n (%)	positiv	13 (65)
	negativ	7 (35)
Anti-CCP-Antikörper n (%)	positiv	16 (80)
	negativ	4 (20)
Orale Glukokortikoidtherapie n (%)		14 (70)
DMARD n (%)		19 (95)
	MTX	14 (74)
	Arava	3 (16)
	Sonstige	2 (10)

Die bisherige Therapie der Rheumatoiden Arthritis kann in Glukokortikoidtherapie und Therapie mit einem *disease-modifying anti-rheumatic drug* (DMARD) eingeteilt werden. Eine orale Glukokortikoidtherapie hatten 14 der 20 Patienten (70%), davon 5 (36%) eine Therapie mit Lodotra, einem verzögert wirksamen Glukokortikoid. Acht Patienten (57%) hatten eine Therapie mit Prednisolon und ein Patient (7%) eine Kombinationstherapie aus Lodotra und Prednisolon. Die mittlere Dosis der oralen Glukokortikoidtherapie betrug 4,53mg und reichte von 2 bis 8mg. Sechs Patienten (30%) hatten keine Glukokortikoidtherapie. Eine DMARD-Therapie hatten 95% des Patientenkollektivs. Methotrexat (MTX) war das meist eingesetzte DMARD bei 14 Patienten (74%). Im Mittel hatten diese Patienten eine MTX-Dosis von 14,17mg (7,5-25). Drei Patienten (16%) hatten eine Therapie mit Leflunomid, ein Patient (5%) mit dem Antimalariamittel Quensyl und ein Patient (5%) hatte eine Kombination aus Methotrexat und Quensyl. Die mittlere Dosis von Leflunomid betrug

13,33mg (10-20). Quensyl wurde mit einer Dosierung von 200mg eingenommen. Ein Patient (5%) war ohne Basistherapeutikum.

3.1.2 Nebenwirkungen

Insgesamt war die Therapie mit dem anti-TNF-Blocker Etanercept nebenwirkungsarm. Zu den häufigsten Nebenwirkungen gehörte eine erhöhte Infektneigung mit Infektionen der oberen Atemwege. Unter den Patienten der Studie hatten 10 Patienten (53%) im Laufe der Therapie einen respiratorischen Infekt. Davon mussten drei (30%) antibiotisch behandelt werden. Eine Patientin (10%) hatte einen zweiten respiratorischen Infekt und eine Patientin (10%) hatte zusätzlich eine gynäkologische Infektion, die antibiotisch behandelt werden musste.

3.1.3 Verlauf der Therapie

Der Verlauf der anti-TNF-Therapie wurde in der vorliegenden Studie 24 Wochen beobachtet. Zwei Patientinnen (10%) mussten die Studie aufgrund von Wirkversagen der Therapie vorzeitig verlassen. Bereits nach 8 Wochen wurde bei einer Patientin die anti-TNF-Therapie wegen Nichtansprechen und Wirkversagen von Etanercept beendet. Die andere Patientin beklagte nach 12 Wochen ETA-Therapie unzureichendes Ansprechen. Bei deutlicher Krankheitsaktivität wurde auch hier die Entscheidung zum Abbruch der Therapie getroffen. Diese Patientinnen wurden nicht regulär von der Auswertung ausgeschlossen, um eine Verzerrung in Richtung besseres Ansprechen auf die anti-TNF-Therapie zu verhindern.

Eine Patientin konnte nur für die Baseline-Daten herangezogen werden, da sich im Verlauf der Therapie herausstellte, dass sie sich stets nur die halbe Dosierung Etanercept verabreicht hatte. Sie wurde aus den Verlaufsuntersuchungen ausgeschlossen, da das Ansprechen bei ihr durch die niedrigere Dosierung beeinflusst wurde. Somit wurden 19 Patienten für die Follow-up Auswertungen herangezogen. Es beendeten 17 der 19 Patienten (89%) die Studie nach 24 Wochen regulär.

Zur besseren Abheilung eines Infekts oder zur Wundheilung war es bisweilen nötig die anti-TNF-Therapie zu unterbrechen. Da Etanercept eine kurze Halbwertszeit hat und daher wöchentlich gegeben wird, ist eine Pausierung möglich und muss klinisch individuell abgewogen werden. Insgesamt pausierten sechs Patienten (32%) die Etanercept-Therapie einmalig für mindestens eine Woche aufgrund eines Infekts. Drei Patienten unterbrachen die Therapie eine Woche, eine Patientin musste zwei Injektionen aussetzen und ein Patient pausierte die Etanercept-Gabe für drei Wochen. Eine Patientin musste bei zwei Infekten je zwei Etanercept-Gaben aussetzen.

3.1.4 Therapieansprechen

Das Therapieansprechen auf eine anti-TNF-Therapie wurde gemäß den EULAR-Response-Kriterien bewertet. Dabei erfolgte anhand des aktuellen DAS28-Wertes und der DAS28-Änderung die Zuordnung zu den Rängen gut, mittel und schlecht.

In der Patientenkohorte zeigten 10 Patienten (53%) ein gutes Ansprechen und 7 Patienten (37%) ein mittleres Ansprechen. Zwei Patienten (10%) haben schlecht auf die Therapie mit Etanercept angesprochen. Um die Patienten in Responder und Non-Responder einzuteilen, mussten 2 Ränge zusammengeführt werden. Aufgrund von Kenntnis des Therapieverlaufs und klinischer Erfahrung wurde in dieser Studie folgende Einteilung gewählt. Als Responder galten die Patienten mit gutem Therapieansprechen nach EULAR. Die Patienten mit mittlerem und mit schlechtem Ansprechen wurden zu der Gruppe der Non-Responder zusammengefasst (Tab.4). Damit gelten 53% der Patienten als Responder und 47% als Non-Responder.

Tabelle 4: Zuordnung des Therapieansprechens zu den Gruppen Responder und Non-Responder.

Gruppe	Therapieansprechen	Anzahl	%	gesamt	% gesamt
Responder	gutes Ansprechen	10	53	10	53
Non-Responder	mittleres Ansprechen	7	37	9	47
	schlechtes Ansprechen	2	10		

Um die Feinheiten der klinischen Untersuchungen in die Auswertung mit einzubeziehen, wurden außerdem die Einzelparameter unter Therapie zur Beurteilung der Therapieresponse herangezogen. Der Verlauf der klinischen Parameter DAS28, Anzahl der geschwollenen Gelenke, BSG, CRP, VAS und Morgensteifigkeit unter Etanercept-Therapie ist in der Abbildung 4 dargestellt. Außer CRP fielen alle Parameter unter Therapie signifikant ab. Die Ergebnisse beziehen sich jeweils auf den Ausgangswert zu Studienbeginn, zu Baseline (BL).

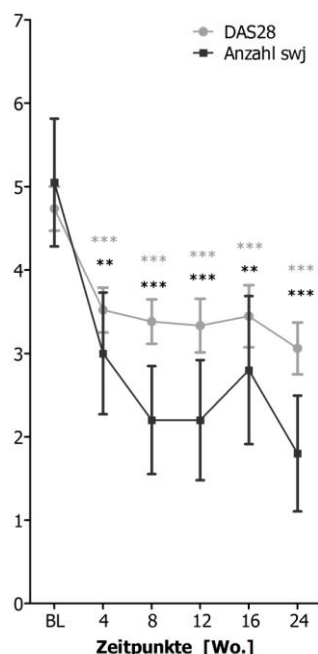
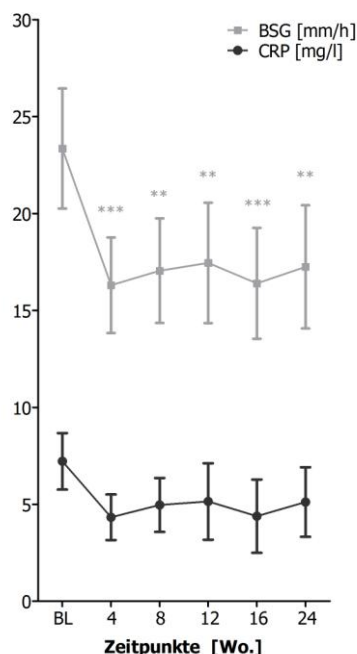
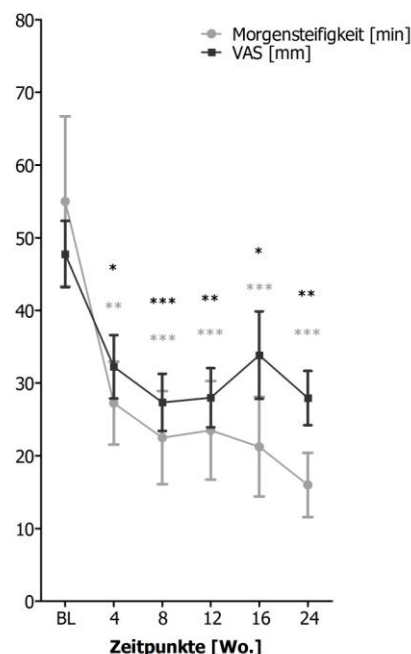
4A**4B****4C**

Abbildung 4: Verlauf der klinischen Parameter unter Etanercept-Therapie (n=19). DAS28 und Anzahl der geschwollenen Gelenke (swj) (4A), BSG und CRP (4B), Morgensteifigkeit und VAS (4C). Dargestellt ist der Mittelwert mit SEM. Zur statistischen Auswertung wurden bivariate Analysen mit gepaartem t-Test durchgeführt. Die signifikanten Ergebnisse beziehen sich auf den Ausgangswert zu Studienbeginn (BL).

3.2 Ergebnisse aus zellbiologischen Experimenten

3.2.1 Expression von membranständigem TNF, TNFR1 und TNFR2 auf der Zelloberfläche von RA-Monozyten zu Studienbeginn

Es ist bekannt, dass der Tumornekrosefaktor (TNF) sowohl in löslicher (sTNF) als auch in membranständiger Form (tmTNF) vorkommt. Da tmTNF das zentrale Molekül des Reverse Signaling darstellt, wurde zunächst die Expression von tmTNF auf RA-Monozyten untersucht. Dafür wurden die Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach Färbung mit einem FITC-markierten Antikörper bzw. der passenden Isotypkontrolle gemessen.

Abbildung 5 zeigt ein repräsentatives Histogramm (Abb.5A) und die tmTNF-Expression der Patientenkohorte (Abb.5B). Insgesamt zeigten die Patienten eine messbare Expression von tmTNF mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von $14,23 \pm 3,04$.

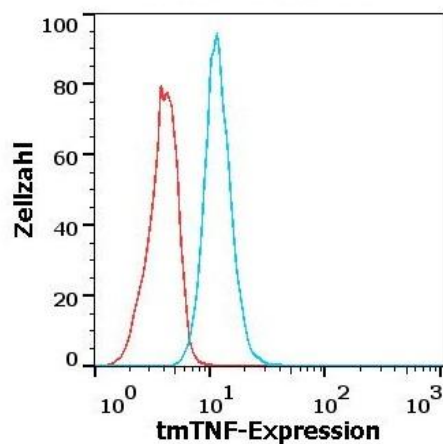
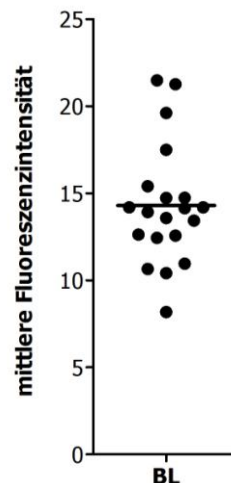
5A**5B**

Abbildung 5: Expression von tmTNF auf RA-Monozyten der Patientenkohorte zu Studienbeginn (n=20). Die isolierten Monozyten der RA-Patienten wurden mit einem FITC-markierten anti-TNF-Antikörper bzw. einer Isotypkontrolle inkubiert. Im Anschluss wurde die Expression durchflusszytometrisch bestimmt.

5A) Histogramm eines repräsentativen Ergebnisses der tmTNF-Expression auf RA-Monozyten. Rote Linie = Isotyp, blaue Linie = tmTNF-Antikörper.

5B) Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität der tmTNF-Expression jedes einzelnen Patienten. Die Linie zeigt den Mittelwert der Patientenkohorte.

Desweiteren wurde die Expression der TNF-Rezeptoren 1 und 2 durchflusszytometrisch analysiert, da sie ebenfalls eine große Rolle im TNF-System spielen. Die Monozyten der RA-Patienten exprimieren TNFR1 (Abb.6A) mit einer mittleren Fluoreszenzintensität von $31,84 \pm 12,99$ (Abb.6B).

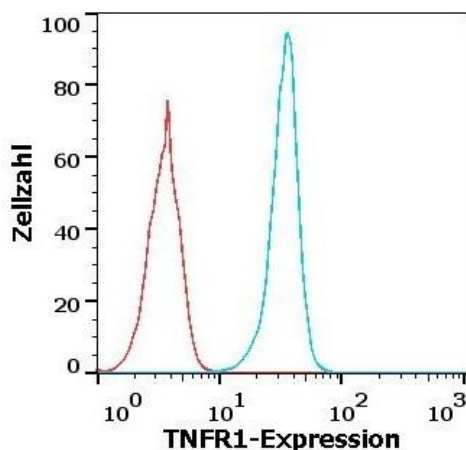
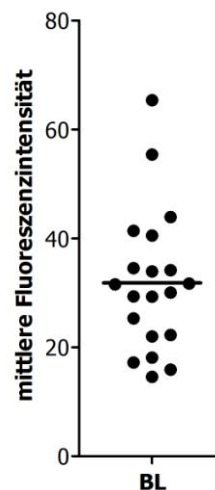
6A**6B**

Abbildung 6: Expression von TNFR1 auf RA-Monozyten der Patientenkohorte zu Studienbeginn (n=20). Die isolierten Monozyten der RA-Patienten wurden mit einem PE-markierten anti-TNFR1-Antikörper bzw. einer Isotypkontrolle inkubiert. Im Anschluss wurde die Expression durchflusszytometrisch bestimmt.

6A) Histogramm eines repräsentativen Beispiels der TNFR1-Expression auf RA-Monozyten. Rote Linie = Isotyp, blaue Linie = TNFR1-Antikörper.

6B) Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität der TNFR1-Expression jedes einzelnen Patienten. Die Linie zeigt den Mittelwert der Patientenkohorte.

Ein repräsentatives Beispiel für die TNFR2-Expression der RA-Monozyten zeigt Abbildung 7A. Es konnte insgesamt eine mittlere Fluoreszenzintensität von $30,02 \pm 8,9$ ermittelt werden (Abb.7B).

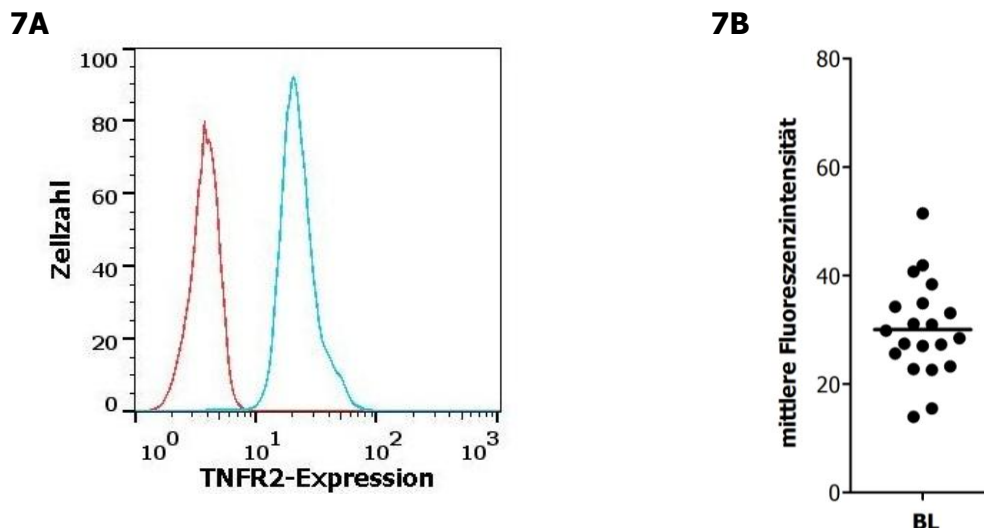


Abbildung 7: Expression von TNFR2 auf Monozyten der Patientenkohorte zu Studienbeginn (n=20). Die isolierten Monozyten der RA-Patienten wurden mit einem FITC-markierten anti-TNFR2-Antikörper bzw. einer Isotypkontrolle inkubiert. Im Anschluss wurde die Expression mittels FACS-Analyse gemessen.

7A) Histogramm eines repräsentativen Beispiels der TNFR2-Expression auf RA-Monozyten. Rote Linie=Isotyp, blaue Linie=TNFR2-Antikörper.

7B) Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität der TNFR2-Expression jedes einzelnen Patienten. Die Linie zeigt den Mittelwert der Patientenkohorte.

3.2.2 Untersuchung der Spontanapoptose und der Reverse Signaling induzierten Apoptose von RA-Monozyten zu Studienbeginn

Ziel der Studie war es, die Bedeutung der anti-TNF-induzierten Apoptose von Monozyten für die Vorhersage des Therapieansprechens auf anti-TNF-Therapie bei RA-Patienten zu untersuchen. Daher war die Analyse der Apoptose von Monozyten in Kultur notwendig.

Es wurde bereits beschrieben, dass Monozyten von RA-Patienten eine erhöhte Spontanapoptose (SpA) in Kultur und in vivo zeigen. Außerdem ist bekannt, dass die Inkubation von RA-Monozyten mit einem anti-TNF-Antikörper via tmTNF und Reverse Signaling (RS) Apoptose induziert [75]. In der vorgestellten Studie wurde dieser Sachverhalt mit dem TNF-Inhibitor Etanercept untersucht.

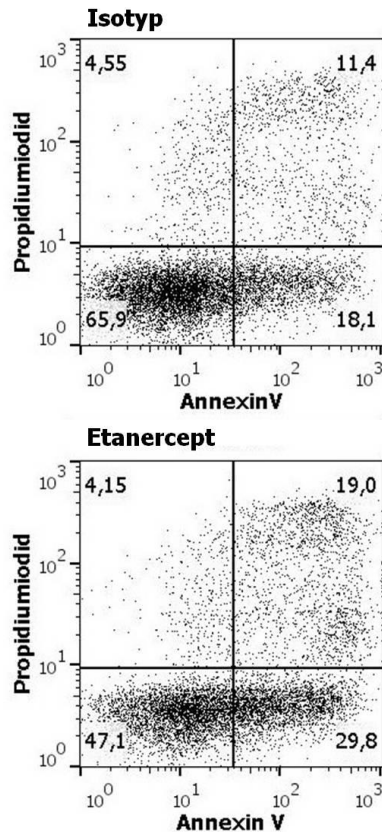
In einem Kulturanatz wurden RA-Monozyten mit Rituximab bzw. Etanercept inkubiert. Nach Färbung der Zellen mit APC-markiertem Annexin V und Propidiumiodid wurden die Monozyten mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Die Reverse Signaling induzierte Apoptose (RSIA) ist die Differenz der % apoptotischen Zellen nach Inkubation mit Etanercept und der % apoptotischen Zellen nach Inkubation mit dem Kontrollantikörper.

Die RA-Monozyten reagierten unterschiedlich stark auf die jeweiligen Stimuli.

Abbildung 8A zeigt ein repräsentatives Beispiel mit einer niedrigen Spontanapoptose. Außerdem ist der Anteil der Annexin V-positiven apoptotischen Zellen nach Stimulation mit ETA deutlich erhöht. In Abbildung 8B ist ein Beispiel für eine hohe Spontanapoptose von RA-Monozyten zu sehen. Durch Etanercept konnte in diesem Fall keine Steigerung der Apoptose in den Monozyten induziert werden.

8A



8B

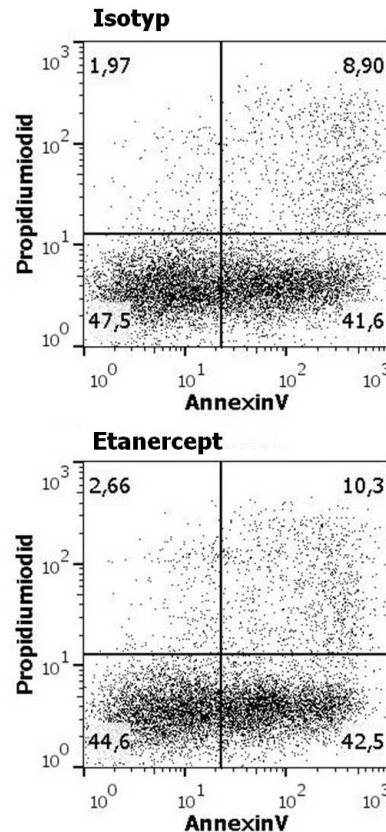


Abbildung 8: SpA und RSIA von RA-Monozyten. Monozyten von RA-Patienten wurden 16 Stunden mit einer Isotypkontrolle bzw. mit Etanercept inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel für hohe (8A) und niedrige (8B) RS induzierte Apoptose als FACS-Blot.

Die Verteilung der Spontanapoptose und der RS induzierten Apoptose von RA-Monozyten ist in Abbildung 9 dargestellt. Die Spontanapoptose wies einen Median von 28,81% apoptotische Zellen auf (10,39% – 40,38%) (Abb.9A). Die RS induzierten Apoptose zeigte eine Streuung um den Median von 2,12% apoptotische Zellen (-27,06% – 11,63%) (Abb.9B).

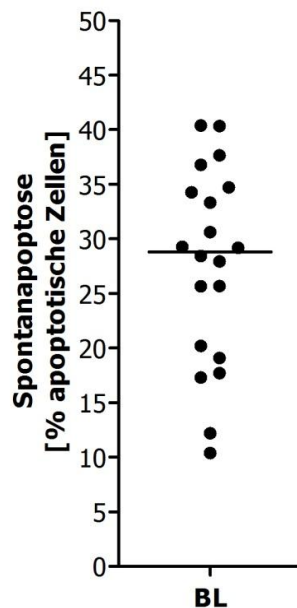
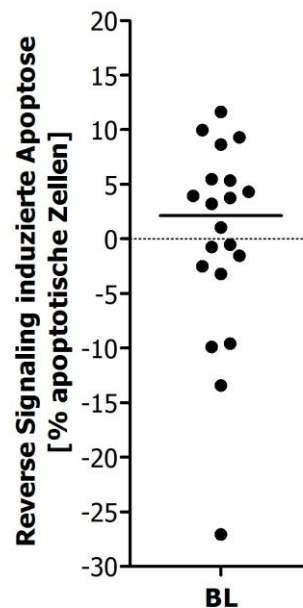
9A**9B**

Abbildung 9: SpA und RSIA von Monozyten der Patientenkohorte zu Studienbeginn. Monozyten von RA-Patienten wurden 16 Stunden mit einer Isotypkontrolle bzw. mit Etanercept inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt ist die Verteilung der SpA (9A, n=20) und der RSIA (9B, n=20) der RA-Monozyten jedes einzelnen Patienten (Linie = Median). Die RSIA berechnet sich aus der Subtraktion von den % apoptotischen Zellen der Isotypkontrolle und den % apoptotischen Zellen nach Inkubation mit Etanercept.

Die Analyse der Monozytenapoptose ergab folgende Ergebnisse. Es gab Patienten, deren Monozyten niedrige bzw. hohe Spontanapoptose zeigten. Desweiteren ließen sich auch bei der Reverse Signaling induzierten Apoptose deutliche Unterschiede innerhalb der Patientenkohorte beobachten.

Es sollte im weiteren Verlauf untersucht werden, ob diese Befunde im Zusammenhang stehen. Dazu wurde eine Einteilung zur Darstellung der Apoptose von RA-Monozyten getroffen, die auch in folgenden Analysen Anwendung fand.

Die Patientenkohorte ließ sich anhand der Höhe der Spontanapoptose in zwei Gruppen einteilen (Abb.10). Innerhalb dieser Gruppen unterschied sich die RS induzierte Apoptose deutlich.

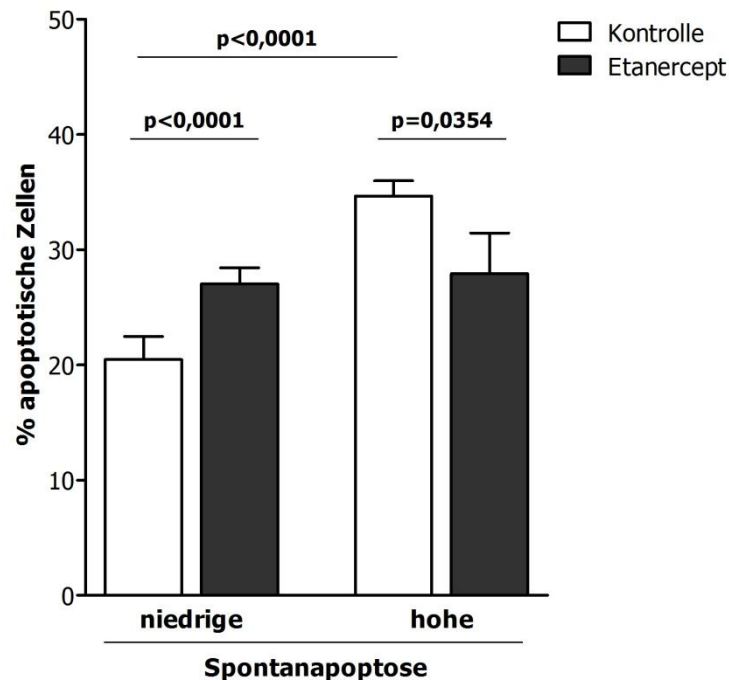


Abbildung 10: Gruppeneinteilung der Monozyten von RA-Patienten anhand niedriger (n=10) und hoher (n=10) Spontanapoptose zu Studienbeginn. Monozyten von RA-Patienten wurden 16 Stunden mit einer Isotypkontrolle bzw. mit Etanercept inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Dargestellt sind die Annexin V-positiven, apoptotischen Zellen. Die Signifikanzniveaus sind Ergebnisse von bivariaten Analysen mit gepaartem und ungepaartem t-Test.

In der Gruppe mit niedriger Spontanapoptose zeigten die RA-Monozyten eine signifikant erhöhte RSIA ($p < 0,0001$). Weiterhin konnte bei Monozyten der Patientenkohorte mit hoher Spontanapoptose eine niedrigere RSIA beobachtet werden ($p = 0,0354$).

Es lässt sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der Spontanapoptose und der Reverse Signaling induzierten Apoptose vermuten.

Um dies genau zu analysieren, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt (Abb.11).

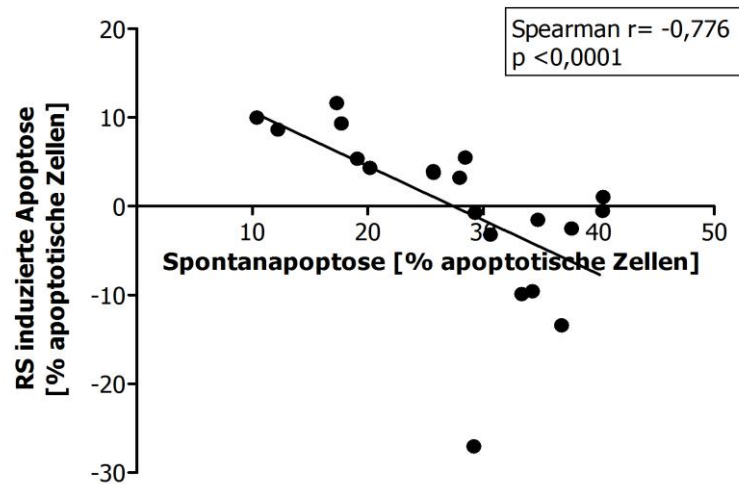


Abbildung 11: Korrelationsanalyse von Spontanapoptose und RS induzierter Apoptose von RA-Monozyten (n=20). Monozyten von RA-Patienten wurden 16 Stunden mit einer Isotypkontrolle bzw. mit Etanercept inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Die RSIA ist die Differenz von den % apoptotischen Zellen unter Etanercept und den % apoptotischen Zellen unter Isotypkontrolle. (Korrelationsanalyse nach Spearman)

RA-Monozyten der Patientenkohorte zeigen eine signifikante negative Korrelation von SpA und RSIA (Spearman $r = -0,776$; $p < 0,0001$). Je höher die Spontanapoptose der Monozyten ist, umso niedriger ist die RSIA.

3.3 Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Klinik, Therapie und experimentell erhobenen Parametern

3.3.1 Zusammenhang von Krankheitsaktivität und experimentellen Parametern zu Studienbeginn

Um zu untersuchen, ob die Aktivität der Erkrankung zu Studienbeginn einen Einfluss auf die experimentell erhobenen Parameter hat, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt (Tab.5).

Tabelle 5: Korrelationsanalysen der klinischen mit den experimentellen Parametern zu Studienbeginn (n=20).
 DAS28 = disease activity score mit 28 Gelenken; Anzahl swj = Anzahl der geschwollenen Gelenke; CRP = C-reaktives Protein; BSG = Blutsenkungsgeschwindigkeit; Mst = Morgensteifigkeit; VAS = visuelle Analogskala zur Beurteilung der Krankheitsaktivität durch den Patienten. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt. (Korrelationsanalyse nach Spearman)

Experimentelle Parameter	Klinische Parameter	Korrelationskoeffizient Spearman	p-Wert
Spontanapoptose [%]	DAS28	0,029	0,896
	Anzahl swj	0,252	0,277
	CRP	-0,027	0,906
	BSG	-0,255	0,272
	Morgensteifigkeit	-0,678	0,0009
	VAS	0,132	0,572
RS induzierte Apoptose [%]	DAS28	0,017	0,942
	Anzahl swj	-0,07	0,767
	CRP	0,081	0,729
	BSG	0,366	0,111
	Morgensteifigkeit	0,486	0,03
	VAS	-0,079	0,733
transmembraner TNF (Mittelwert)	DAS28	0,028	0,901
	Anzahl swj	0,062	0,792
	CRP	0,29	0,21
	BSG	0,318	0,167
	Morgensteifigkeit	0,031	0,896
	VAS	-0,00004	0,997

Als klinische Parameter für die Krankheitsaktivität wurde der DAS28, die Zahl der geschwollenen Gelenke (swj), das CRP, die BSG, die Dauer der Morgensteifigkeit und die Angabe des Patienten zur Krankheitsaktivität (VAS) untersucht.

Für die Analyse von Morgensteifigkeit und Spontanapoptose ergab sich eine signifikante negative Korrelation ($r=-0,595$; $p=0,006$; Abb.12A). Umgekehrt korreliert die RSIA signifikant positiv mit der Morgensteifigkeit ($r=0,445$; $p=0,049$; Abb.12B). Für weitere klinische Parameter zeigte sich kein Einfluss auf die Spontanapoptose oder RS induzierte Apoptose. Die Expression von tmTNF korreliert nicht mit den klinischen Parametern.

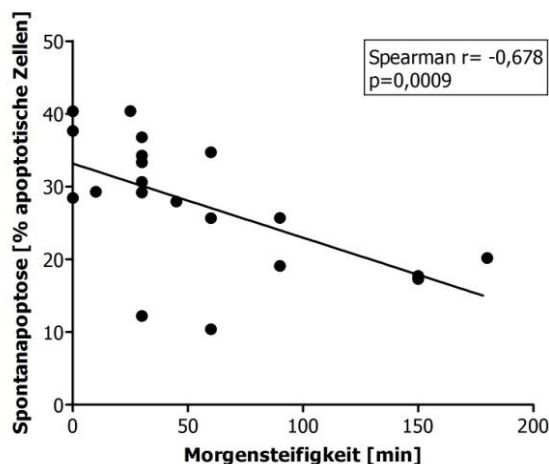
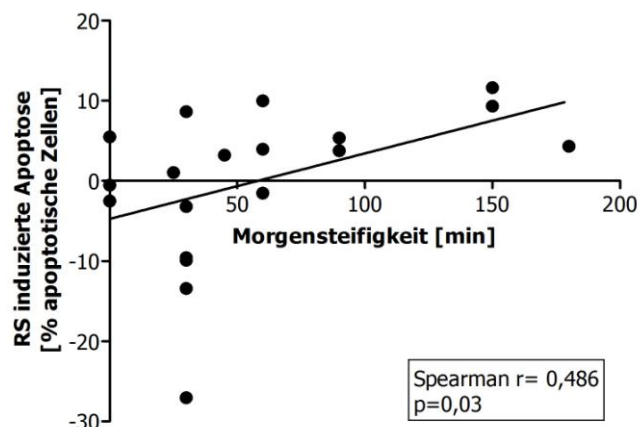
12A**12B**

Abbildung 12: Korrelationsanalyse von Morgensteifigkeit und Spontanapoptose (12A) bzw. RS induzierte Apoptose (12B) zu Studienbeginn (n=20). Es wurde die Spontanapoptose bzw. RSIA gegen die Dauer der Morgensteifigkeit in Minuten aufgetragen. (Korrelationsanalyse nach Spearman)

3.3.2 Einfluss der Etanercept-Therapie auf den Verlauf der Apoptose

Eine anti-TNF-Therapie stellt einen großen Eingriff in das Gleichgewicht der Immunzellen dar. Es ist deshalb von Interesse, ob und wie sich die Reaktion der Monozyten unter dieser Therapie verändert. Am Beispiel der SpA und RSIA sollte dies zu Woche 4, Woche 12 und Woche 24 analysiert und mit dem Baseline-Wert zu Studienbeginn verglichen werden.

Zunächst wurde die Spontanapoptose im Verlauf der Therapie untersucht.

Abbildung 13 zeigt, dass die Spontanapoptose bei RA-Monozyten, die zu Baseline eine niedrige Spontanapoptose hatten, unter Etanercept-Therapie tendenziell ansteigt. Die Monozyten, die vor der Therapie eine erhöhte Spontanapoptose zeigten, wiesen unter Etanercept-Therapie eine signifikante Reduktion der Spontanapoptose auf.

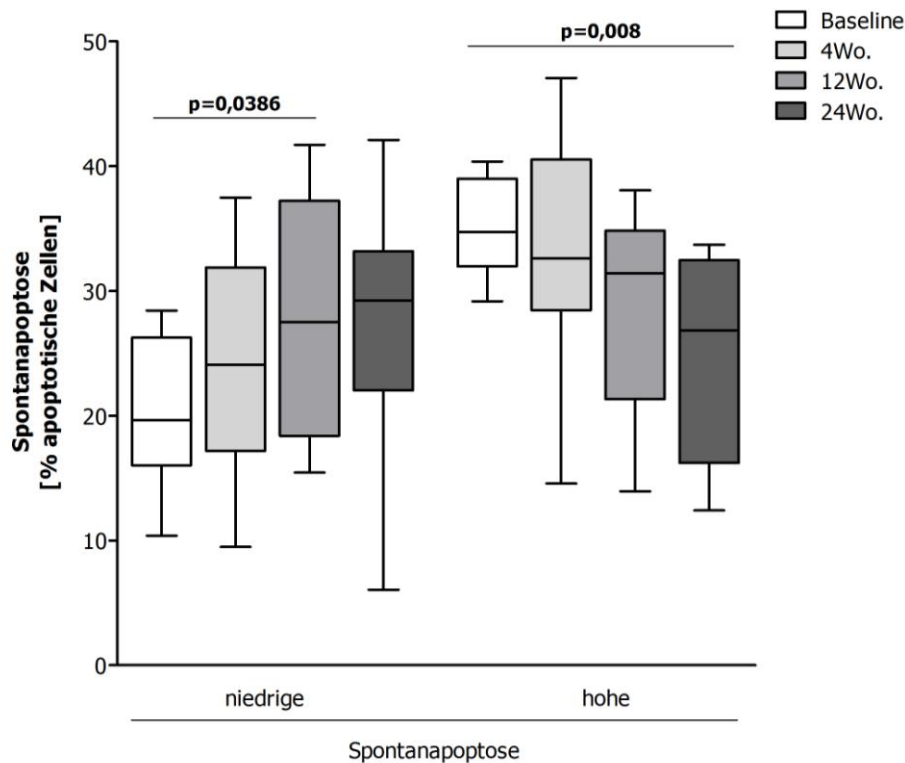


Abbildung 13: Verlauf der SpA von RA-Monozyten unter Etanercept-Therapie in den Gruppen mit niedriger (n=10) und hoher (n=9) SpA zu Studienbeginn. Die RA-Monozyten, die zu Baseline eine niedrige SpA zeigten, wiesen unter Therapie eine signifikante Steigerung der Spontanapoptose auf. Umgekehrt fiel die SpA der Monozyten ab, die zu Baseline eine hohe SpA zeigten. Die Ergebnisse wurden mit einem t-Test für gepaarte Variablen berechnet. (Whisker-Box-Plots mit Median, 25%- und 75%-Intervall, Min und Max)

Der Einfluss der anti-TNF-Therapie auf den Verlauf der RSIA ist in Abbildung 14 dargestellt.

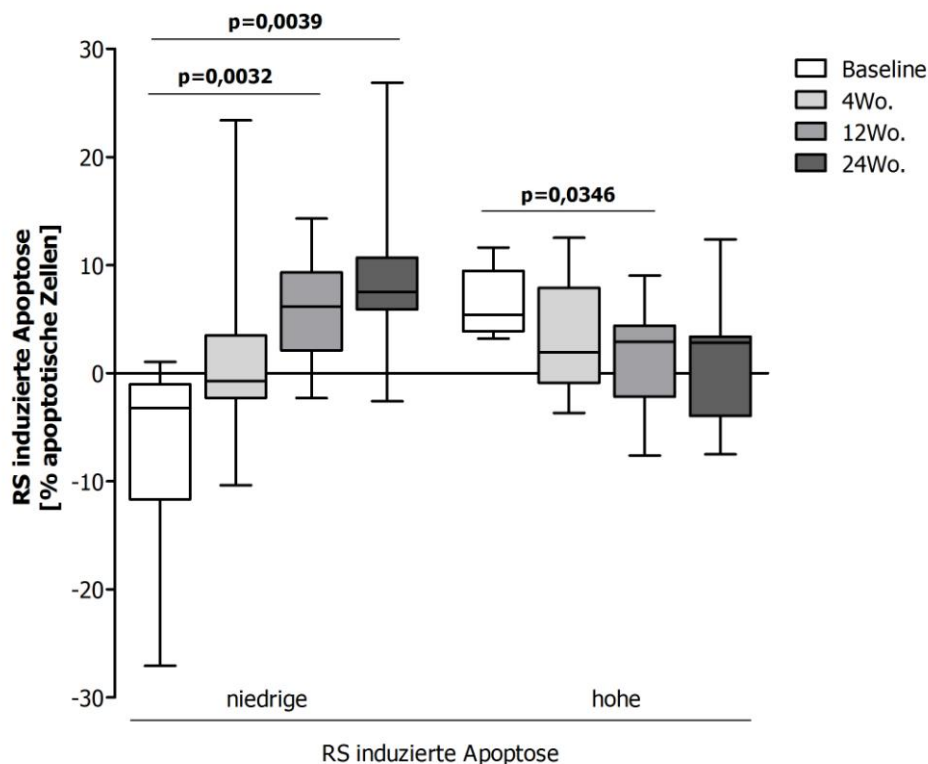


Abbildung 14: Verlauf der RS induzierten Apoptose von RA-Monozyten unter anti-TNF-Therapie mit Etanercept in den Gruppen mit initial niedriger (n=9) und hoher (n=10) RS induzierter Apoptose. RA-Monozyten, die zu Baseline eine niedrige RSIA zeigten, wiesen unter Therapie eine signifikante Steigerung der RSIA auf. Umgekehrt fiel die RSIA der Monozyten ab, die zu Baseline eine hohe RSIA zeigten. Die Ergebnisse wurden mit einem t-Test für gepaarte Variablen berechnet. (Whisker-Box-Plots mit Median, 25%- und 75%-Intervall, Min und Max)

Es wurde ein signifikanter Anstieg der RS induzierten Apoptose zu Woche 12 ($p=0,0032$) und 24 ($p=0,0039$) bei RA-Monozyten beobachtet, die vor Therapie eine niedrige RSIA zeigten. Die Monozyten der RA-Patienten, die zuvor eine hohe RSIA zeigten, wiesen hingegen unter anti-TNF-Therapie eine tendenzielle Reduktion der RSIA auf.

Im Anschluss wurde untersucht, ob verschiedene klinische Parameter einen Einfluss auf den Verlauf der Spontanapoptose bzw. RS induzierte Apoptose unter anti-TNF-Therapie haben. Dabei wurde der Status von Rheumafaktoren, anti-CCP-Antikörpern und anti-nukleären-Antikörpern untersucht. Ebenso wurde der Einfluss der bisherigen Rheumatherapie mit MTX oder DMARDs analysiert. Die bekannten klinischen Faktoren DAS28, Zahl der geschwollenen Gelenke, CRP, BSG, Dauer der Morgensteifigkeit und VAS zu Studienbeginn wurden ebenso einbezogen wie das Ansprechen auf die anti-TNF-Therapie. Die Bedeutung von statistischen Faktoren, wie Geschlecht, Alter und Dauer der Erkrankung wurde ebenfalls berücksichtigt.

Es zeigte sich, dass die Spontanapoptose zwischen Patienten, die gut oder schlecht auf die Therapie ansprachen, unterschiedlich verläuft (Abb.15). Patienten mit gutem Ansprechen wiesen eine Reduktion der Spontanapoptose unter Therapie auf, die zu Woche 24 signifikant war. Eine Tendenz im Sinne eines Anstiegs der Spontanapoptose zeigten Patienten, die schlecht auf die anti-TNF-Therapie angesprochen haben (Woche 24 $p=0,0061$).

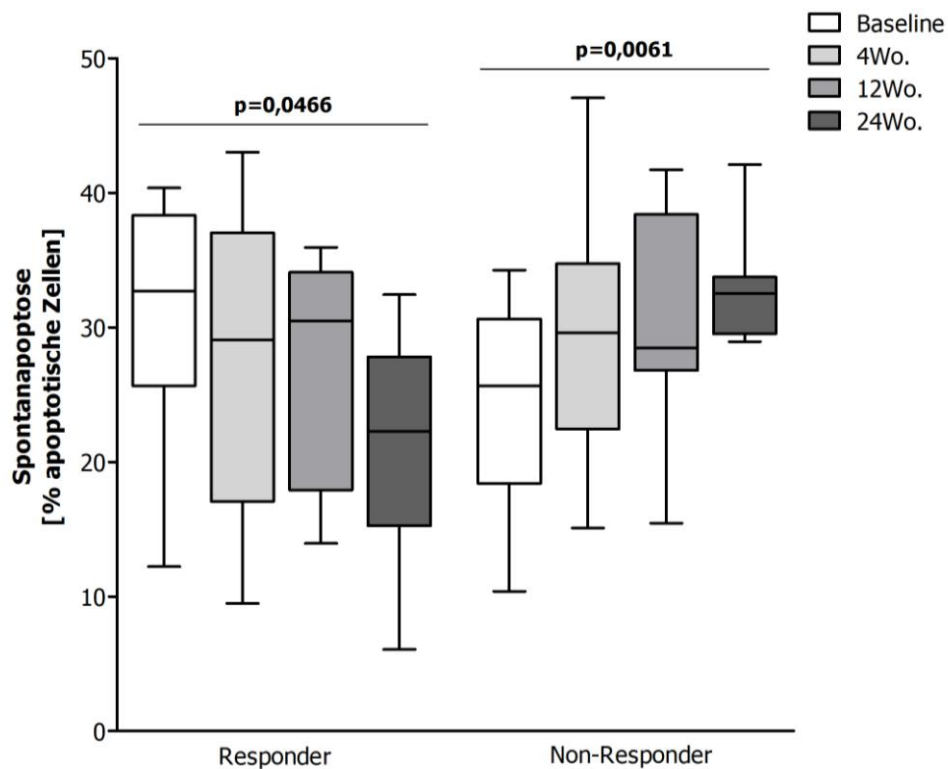


Abbildung 15: Verlauf der Spontanapoptose unter Etanercept-Therapie bei RA-Patienten mit gutem (n=10) und schlechtem (n=9) Ansprechen auf die anti-TNF-Therapie mit Etanercept. Monozyten von RA-Patienten, die gut auf die Therapie ansprachen, zeigten unter Therapie eine Reduktion der Spontanapoptose. Eine Steigerung der Spontanapoptose konnte bei RA-Monozyten von Patienten mit schlechtem Ansprechen beobachtet werden. Die Ergebnisse wurden mit einem t-Test für gepaarte Variablen berechnet. (Whisker-Box-Plots mit Median, 25%- und 75%-Intervall, Min und Max)

Die Dauer der Morgensteifigkeit hatte ebenfalls einen Einfluss auf den Verlauf der Spontanapoptose unter Therapie (Abb.16). Es konnte beobachtet werden, dass Patienten mit einer Morgensteifigkeit von unter 30 Minuten zu Studienbeginn eine signifikante Verminderung der Spontanapoptose unter Therapie aufweisen. Außerdem wurde ein signifikanter Unterschied in der Höhe der Spontanapoptose zu Studienbeginn bei Patienten mit hoher bzw. niedriger Morgensteifigkeit beobachtet ($p=0,0076$), wobei Patienten mit einer Morgensteifigkeit von ≥ 30 Minuten eine niedrigere Spontanapoptose hatten. Dies entspricht der negativen Korrelation (Tab.5) zwischen Morgensteifigkeit und Spontanapoptose.

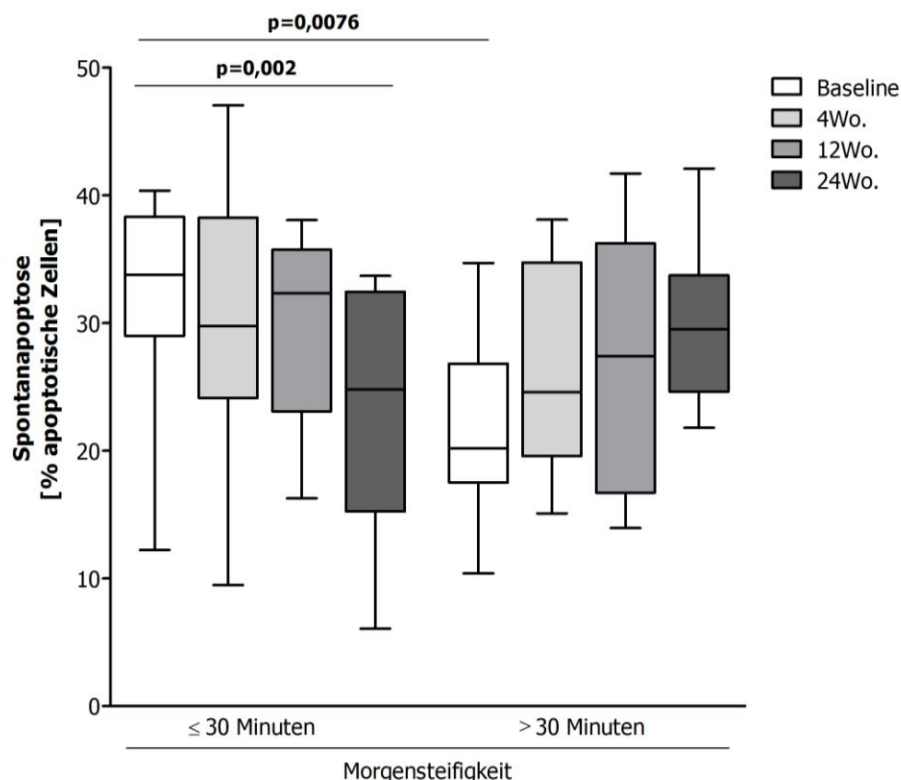


Abbildung 16: Verlauf der Spontanapoptose unter Etanercept-Therapie bei RA-Patienten mit hoher (n=9) und niedriger (n=10) Morgensteifigkeit (Mst). Monozyten von RA-Patienten mit niedriger Mst zeigten unter Therapie eine Reduktion der Spontanapoptose. Eine Steigerung der Spontanapoptose konnte bei RA-Monozyten von Patienten mit schlechtem Ansprechen beobachtet werden. Die Ergebnisse wurden mit einem t-Test für gepaarte Variablen berechnet. (Whisker-Box-Plots mit Median, 25%- und 75%-Intervall, Min und Max)

Bei weiteren Parametern konnte kein signifikanter Einfluss auf den Verlauf der Spontanapoptose unter anti-TNF-Therapie mit Etanercept beobachtet werden (Tab.6). Es zeigte sich lediglich die Tendenz, dass bei höherem Alter der Patienten die Spontanapoptose der RA-Monozyten unter ETA-Therapie absinkt.

Tabelle 6: Einfluss verschiedener Faktoren auf den Verlauf der Spontanapoptose unter anti-TNF-Therapie mit Etanercept. MTX = Methotrexat; RF = Rheumafaktoren; CCP = cyclisches citrulliniertes Peptid; CRP = C-reaktives Protein; BSG = Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit; VAS = visuelle Analogskala; swj = geschwollene Gelenke; DAS28 = *Disease Activity Score* mit 28 Gelenken; die p-Werte in Klammern sind nicht-signifikante Tendenzen der Berechnung Baseline vs. Woche 24 bis p=0,2.

Einflussfaktoren	Tendenz	Bemerkung
Glukokortikoide	↔	
MTX	↔	
RF	↔	
Anti-CCP-AK	↔	
CRP	↔	
BSG	↔	
Morgensteifigkeit	↘↗	Sinkend bei Mst <30min; p=0,002 u.p=0,0076 Steigend bei Mst >30min, n.s. (p=0,078)
VAS	↔	
Anzahl der swj	↔	
DAS28	↔	
klin. Ansprechen	↘↗	Sinkend bei Respondern; p=0,0466 Steigend bei Non-Respondern; p=0,0061
RA-Dauer	↔	
Alter	↘	Sinkend bei > 53 Jahren, n.s. (p=0,168)
Geschlecht	↔	

Die Untersuchungen zu dem Einfluss verschiedener Faktoren auf den Verlauf der RSIA brachten folgende Ergebnisse. Die RSIA verlief unterschiedlich bei Patienten mit hoher und niedriger Morgensteifigkeit (Abb.17). Dabei zeigte sich, dass Patienten mit einer Morgensteifigkeit von unter 30 Minuten zu Baseline eine signifikant steigende Apoptose unter anti-TNF-Therapie mit Etanercept aufweisen. Außerdem ergab sich ein signifikanter Unterschied in der Höhe der RS induzierten Apoptose zu Baseline bei Patienten mit hoher bzw. niedriger Morgensteifigkeit ($p=0,0103$). Patienten mit einer Morgensteifigkeit ≥ 30 Minuten zeigten eine höhere RSIA. Diese Tendenz wurde auch in der positiven Korrelation von Morgensteifigkeit und RSIA festgestellt (Tab.5).

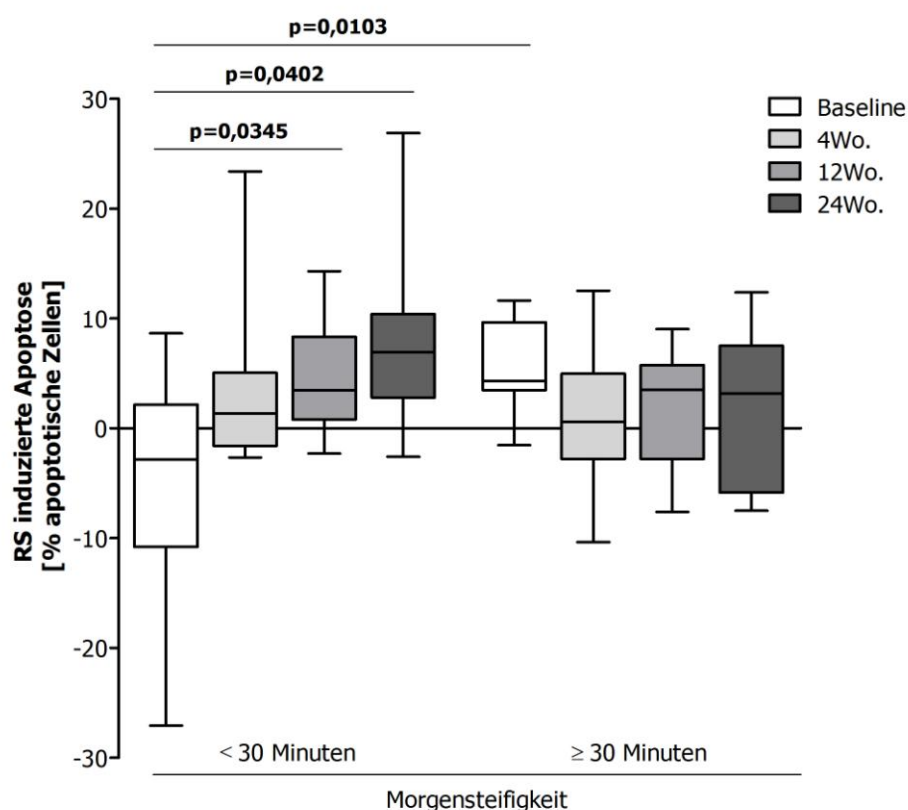


Abbildung 17: Verlauf der RS induzierten Apoptose unter Etanercept-Therapie bei RA-Patienten mit niedriger (n=10) und hoher (n=9) Morgensteifigkeit (Mst). Monozyten von RA-Patienten mit niedriger Mst zeigten unter Therapie einen Anstieg der RSIA. Die Ergebnisse wurden mit einem t-Test für gepaarte Variablen berechnet. (Whisker-Box-Plots mit Median, 25%- und 75%-Intervall, Min und Max)

Die RSIA der Monozyten stieg tendenziell an bei Patienten mit niedriger BSG zu Studienbeginn, bei Respondern und bei Patienten, die älter als 53 Jahre waren. Für andere klinische Parameter konnte kein signifikanter Einfluss auf den Verlauf der RSIA unter Therapie mit Etanercept gezeigt werden (Tab.7).

Tabelle 7: Einfluss verschiedener Faktoren auf den Verlauf der RSIA unter Therapie mit Etanercept. MTX = Methotrexat; RF = Rheumafaktoren; CCP = cyclisches citrulliniertes Peptid; CRP = C-reaktives Protein; BSG = Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit; VAS = visuelle Analogskala; swj = geschwollene Gelenke; DAS28 = *Disease Activity Score* mit 28 Gelenken; die p-Werte in Klammern sind nicht-signifikante Tendenzen der Berechnung Baseline vs. Woche 24 bis p=0,2.

Einflussfaktoren	Tendenz	Bemerkung
Glukokortikoide	↔	
MTX	↔	
RF	↔	
Anti-CCP-AK	↔	
ANA	↔	
CRP	↔	
BSG	↗	Steigend bei BSG <20mmHg/h (p=0,115)
Morgensteifigkeit	↗	Steigend bei Mst <30min; p=0,0345 u. p=0,0402
VAS	↔	
Anzahl der swj	↔	
DAS28	↔	
klin. Ansprechen	↗	Steigend bei Respondern; n.s. (p=0,149)
RA-Dauer	↔	
Alter	↗	Steigend bei > 53 Jahren, n.s. (p=0,0752)
Geschlecht	↔	

3.3.3 Einfluss der Etanercept-Therapie auf den Expressionsverlauf von tmTNF sowie TNFR1 und TNFR2

Es wurde der Verlauf der Expression von tmTNF, TNFR1 und TNFR2 unter Etanercept-Therapie untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Expression von tmTNF unter Therapie keine konkrete Richtung annimmt.

Allenfalls zeigt sich eine nicht-signifikante Tendenz in Richtung Abfall der tmTNF-Expression (Abb.18).

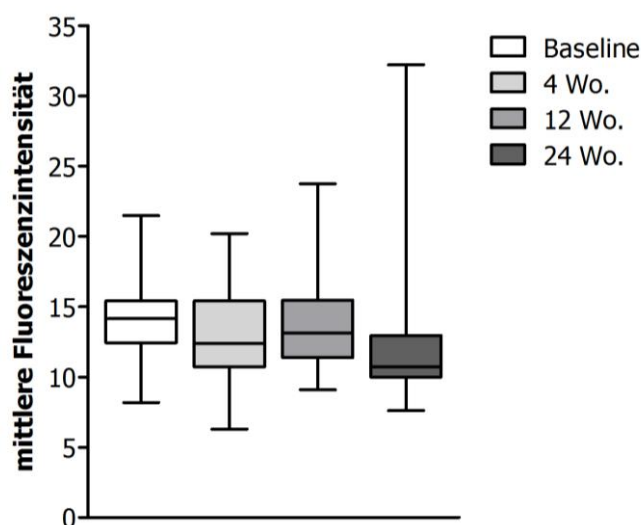


Abbildung 18: Verlauf der tmTNF-Expression von RA-Monozyten unter Etanercept-Therapie (n=19). Es zeigte sich die Tendenz, dass die tmTNF-Expression von RA-Monozyten unter anti-TNF-Therapie mit Etanercept absinkt. (Whisker-Box-Plots mit Median, 25%- und 75%-Intervall, Min und Max)

Um den Verlauf der tmTNF-Expression genauer zu analysieren, wurde untersucht, ob die Höhe der RS induzierten Apoptose zu Baseline Einfluss auf den Verlauf der tmTNF-Expression hat. Abbildung 19 zeigt dazu eine leichte Tendenz zur Verminderung der tmTNF-Expression bei RA-Monozyten mit niedriger RSIA.

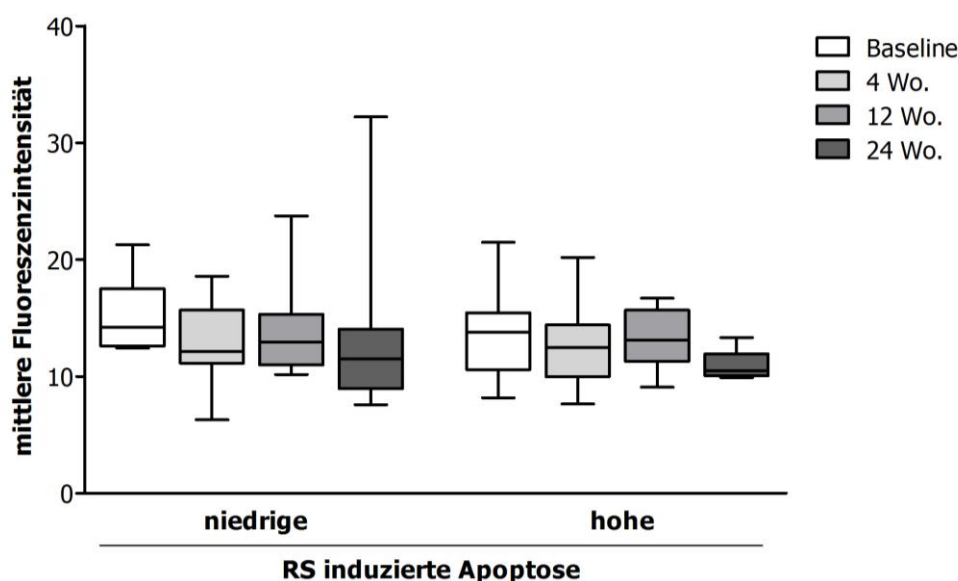


Abbildung 19: Verlauf der tmTNF-Expression unter Therapie mit Etanercept bei Patienten mit niedriger (n=9) bzw. hoher (n=10) RS induzierter Apoptose. Es zeigte sich die Tendenz, dass die tmTNF-Expression bei RA-Monozyten, die initial eine niedrige RSIA aufwiesen, unter einer Etanercept-Therapie absinkt. (Whisker-Box-Plots mit Median, 25%- und 75%-Intervall, Min und Max)

Weiterhin wurde der Einfluss der ETA-Therapie auf die Expression von TNFR1 und TNFR2 untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass die Expression von TNFR1 unter Therapie signifikant abnimmt (Abb.20).

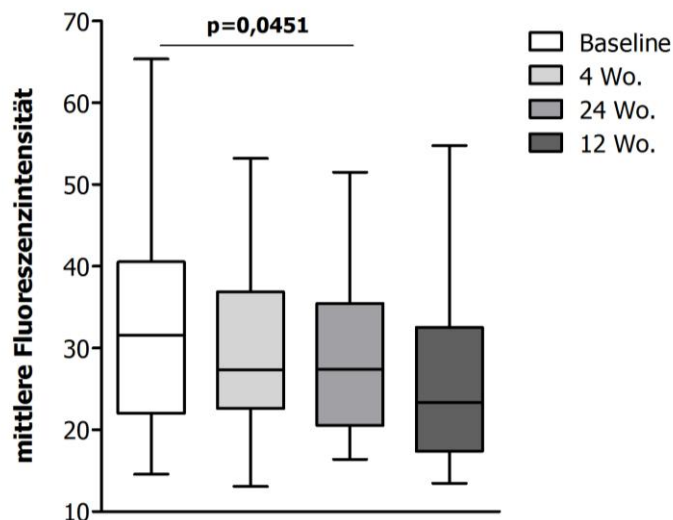


Abbildung 20: Verlauf der TNFR1-Expression unter Etanercept-Therapie bei Patienten mit RA (n=19). Es zeigte sich, dass die TNFR1-Expression von RA-Monozyten unter anti-TNF-Therapie mit Etanercept absinkt. (Whisker-Box-Plots mit Median, 25%- und 75%-Intervall, Min und Max)

Die Expression von TNFR2 auf RA-Monozyten wies hingegen bis Woche 12 unter Etanercept-Therapie einen signifikanten Anstieg auf (Abb.21).

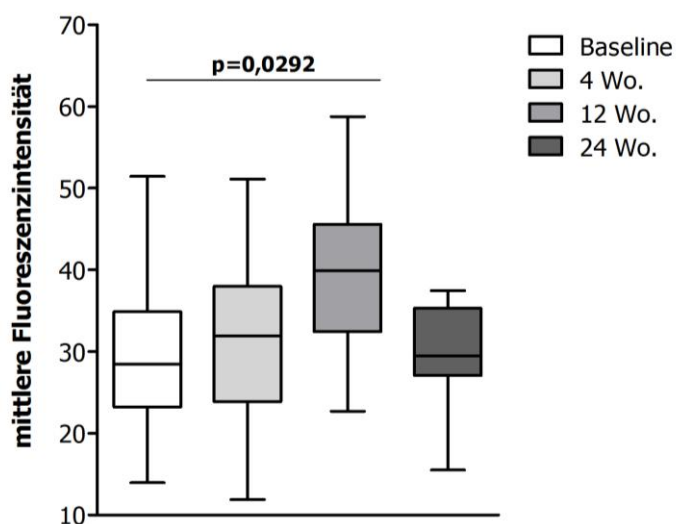


Abbildung 21: Verlauf der TNFR2-Expression unter Etanercept-Therapie bei Patienten mit RA (n=19). Es zeigte sich, dass die TNFR2-Expression von RA-Monozyten unter anti-TNF-Therapie mit Etanercept bis Woche 12 signifikant ansteigt. (Whisker-Box-Plots mit Median, 25%- und 75%-Intervall, Min und Max)

3.3.4 Möglichkeiten der Vorhersage des Therapieansprechens mit Hilfe experimenteller Parameter

Die Untersuchung der Spontanapoptose und RS induzierten Apoptose hinsichtlich ihrer Bedeutung für gutes oder schlechtes Ansprechen ergab für den Fisher-Exact-Test kein signifikantes Ergebnis (Tab.8 und 9). Es zeigte sich jedoch eine Tendenz ($p=0,07$), dass Patienten mit niedriger SpA bzw. hoher RSIA schlecht auf die Therapie ansprechen.

Tabelle 8: Kreuztabelle - Responder und Non-Responder der Etanercept-Therapie und die Zuordnung zu den Gruppen der Spontanapoptose.

	Non-Responder	Responder	gesamt
Niedrige Spontanapoptose	7	3	10
Hohe Spontanapoptose	2	7	9
Gesamt	9	10	19

Tabelle 9: Kreuztabelle - Responder und Non-Responder der Etanercept-Therapie und die Zuordnung zu den Gruppen der RSIA.

	Non-Responder	Responder	gesamt
Niedrige RSIA	2	7	9
Hohe RSIA	7	3	10
Gesamt	9	10	19

Therapieansprechen anhand der Einzelparameter

Untersucht man hingegen die Einzelparameter bzw. die Änderung der klinischen Parameter unter Therapie, ergaben sich signifikante Unterschiede für die Spontanapoptose und die Reverse Signaling induzierte Apoptose. Dabei wurde jeweils die bekannte Einteilung der Apoptose in hoch und niedrig zu Studienbeginn gewählt (Abb.10).

Bedeutung der Spontanapoptose

Zunächst wurde die Bedeutung der Spontanapoptose für die klinische Aktivität analysiert. Abbildung 22 zeigt diesen Sachverhalt anhand der BSG. Patienten, die zu Studienbeginn eine hohe Spontanapoptose aufwiesen, zeigten zu Woche 12, 16 und 24 eine signifikant niedrigere BSG im Vergleich zu den Patienten mit niedriger Spontanapoptose zu Baseline. Die Patienten mit einer hohen Spontanapoptose zu Studienbeginn hatten entsprechend unter der Etanercept-Therapie eine niedrigere Krankheitsaktivität (angegeben mit der BSG) als die Patienten mit hoher Spontanapoptose zu Studienbeginn.

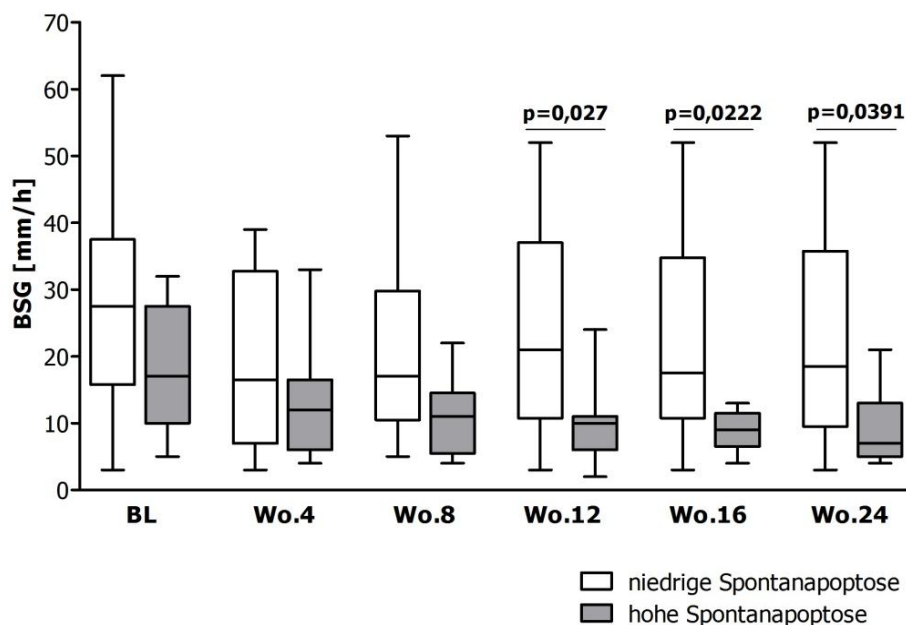


Abbildung 22: Bedeutung der Spontanapoptose für den Verlauf der BSG unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit RA. Patienten mit niedriger Spontanapoptose (SpA) zu Baseline (in weiß, n=10) zeigten zu Woche 12, 16 und 24 eine signifikant höhere BSG als Patienten mit hoher SpA zu Baseline (in grau, n=9). Die signifikanten Ergebnisse wurden mit einem t-Test für ungepaarte Variablen berechnet. Dargestellt sind Whisker-Box-Plots mit Median, 25%- und 75%-Intervall, Min und Max.

Andere Parameter, wie DAS28, CRP, VAS, Morgensteifigkeit oder Zahl der geschwollenen Gelenke zeigten keine signifikanten Unterschiede bezogen auf die Höhe der Spontanapoptose (Tab.10).

Tabelle 10: Bedeutung der Spontanapoptose (SpA) für die Höhe der Krankheitsaktivität (KH-Akt.). DAS28 = Disease Activity Score; swj = geschwollene Gelenke; CRP = C-reaktives Protein; BSG = Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit; VAS = visuelle Analogskala; Mst = Morgensteifigkeit der Gelenke. Die fettgedruckten p-Werte sind signifikant, die anderen p-Werte stellen nicht-signifikante Tendenzen bis p=0,2 dar.

Parameter	Tendenz	BL	4	8	12	16	24
		p-Wert (hohe vs. niedrige SpA)					
DAS28	SpA ↑ = KH-Akt. ↓				0,076	0,154	0,077
swj	↔						
CRP	↔						
BSG	SpA ↑ = KH-Akt. ↓			0,066	0,03	0,022	0,04
VAS	↔						
Mst	SpA ↑ = KH-Akt. ↓	0,01	0,05		0,11	0,14	

Es wurde bereits erwähnt, dass zur Einschätzung des Therapieansprechens zusätzlich die Veränderungen der Einzelparameter unter Therapie herangezogen wurden. Der Wert für die Änderung der Parameter ist die Differenz der Werte zu den jeweiligen Wochenterminen abzüglich des Wertes zu Studienbeginn.

Die Änderung des C-reaktiven Proteins unter Therapie ist negativ, das heißt man kann von einem CRP-Abfall sprechen. Dieser verlief bei Patienten mit hoher oder niedriger Spontanapoptose unterschiedlich (Abb.23).

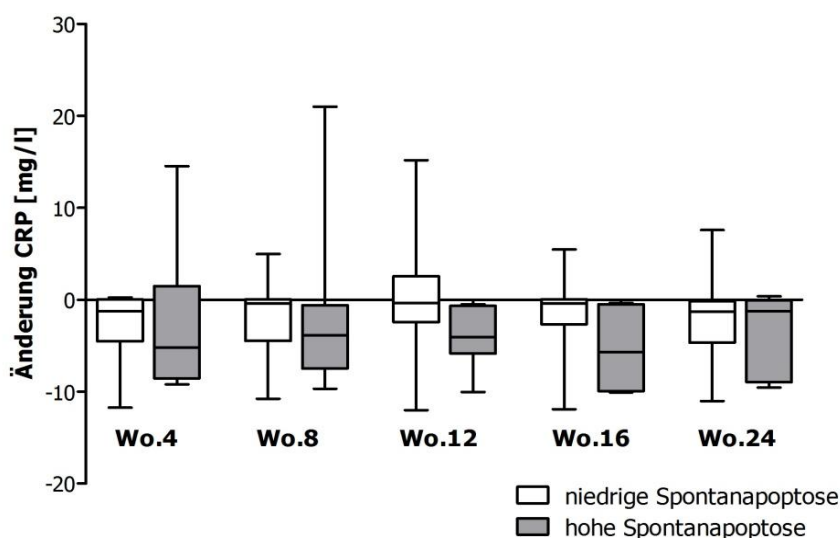


Abbildung 23: Bedeutung der SpA für die Änderung des C-reaktiven Proteins unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit RA. Patienten mit niedriger Spontanapoptose (SpA) zu Baseline (in weiß, n=10) zeigten zu Woche 8, 12 und 16 einen signifikant niedrigeren CRP-Abfall als Patienten mit hoher SpA zu Baseline (in grau, n=9). Die signifikanten Ergebnisse wurden mit einem t-Test für ungepaarte Variablen berechnet. Dargestellt sind Whisker-Box-Plots mit Median, 25%- und 75%-Intervall, Min und Max.

Dabei zeigte die Gruppe mit hoher Spontanapoptose einen höheren CRP-Abfall unter Therapie als die Gruppe mit niedriger Spontanapoptose zu Baseline. Dieser Unterschied war zu Woche 8, 12 und 16 signifikant.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Änderung des DAS28 unter Therapie (Abb.24). Patienten mit hoher Spontanapoptose zu Studienbeginn wiesen auch hier einen höheren DAS28-Abfall unter Therapie im Gegensatz zu Patienten mit niedriger Spontanapoptose zu Baseline auf. Signifikante Ergebnisse konnten zu Woche 12 ($p=0,0172$), 16 ($p=0,0235$) und 24 ($p=0,0309$) berechnet werden.

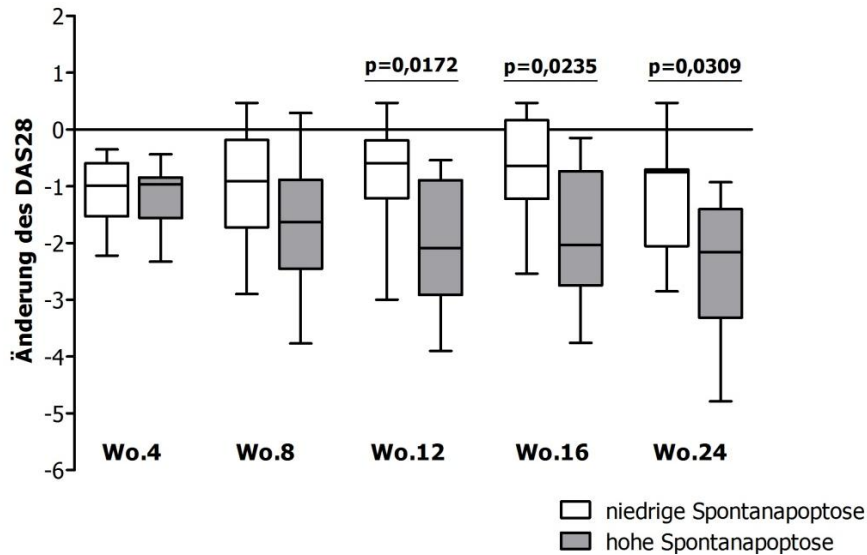


Abbildung 24: Relevanz der Spontanapoptose für die Änderung des DAS28 unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit RA. Patienten mit niedriger Spontanapoptose (SpA) zu Baseline (in weiß, $n=10$) zeigten zu Woche 12, 16 und 24 einen signifikant niedrigeren DAS28-Abfall als Patienten mit hoher SpA zu Baseline (in grau, $n=9$). Die signifikanten Ergebnisse wurden mit einem t-Test für ungepaarte Variablen berechnet. Dargestellt sind Whisker-Box-Plots mit Median, 25%- und 75%-Intervall, Min und Max.

Hinsichtlich der Veränderung der Anzahl geschwollener Gelenke unter Therapie zeigte sich eine entsprechende Tendenz bezüglich der Höhe der Spontanapoptose (Abb.25). Bei Patienten mit hoher Spontanapoptose zu Baseline konnte unter Etanercept-Therapie eine stärkere Reduktion der Anzahl geschwollener Gelenke beobachtet werden, wobei dies zu Woche 8 mit $p=0,0302$ signifikant war.

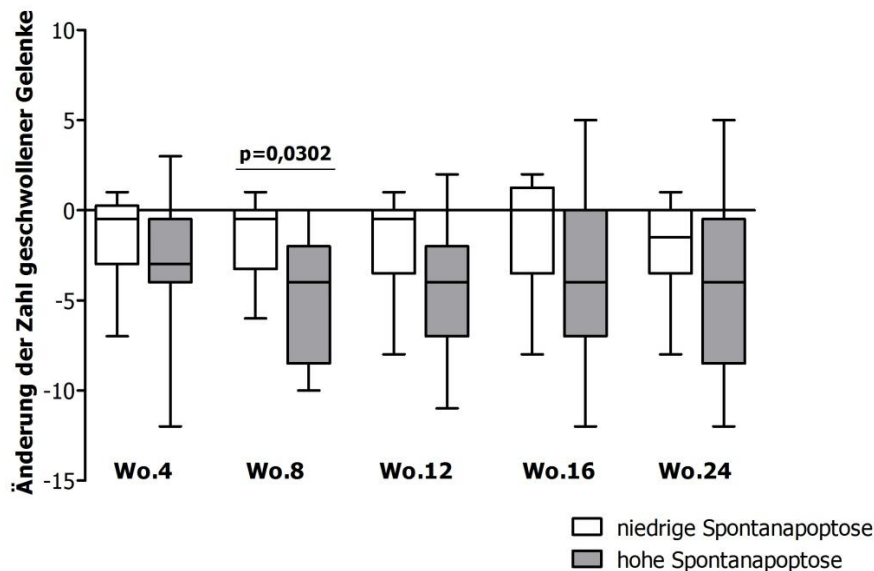


Abbildung 25: Bedeutung der Spontanapoptose für die Änderung der Anzahl der geschwollenen Gelenke unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit RA. Patienten mit niedriger Spontanapoptose (SpA) zu Baseline (in weiß, n=10) zeigten zu Woche 8 einen signifikant niedrigeren Abfall der Anzahl geschwollener Gelenke als Patienten mit hoher SpA zu Baseline (in grau, n=9). Das signifikante Ergebnis wurde mit einem t-Test für ungepaarte Variablen berechnet. (Whisker-Box-Plots mit Median, 25%- und 75%-Intervall, Min und Max)

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass Patienten mit hoher Spontanapoptose zu Studienbeginn im Laufe der Therapie eine niedrigere Krankheitsaktivität hatten bzw. besser auf die Therapie ansprachen.

Bezüglich der Veränderung der Morgensteifigkeit sah man ein anderes Bild (Abb.26). Patienten mit hoher Spontanapoptose zeigten eine geringere Reduktion der Morgensteifigkeit unter anti-TNF-Therapie mit Etanercept als Patienten mit niedriger Spontanapoptose. Dies war zu Woche 4 ($p=0,0251$) und zu Woche 8 ($p=0,0129$) signifikant.

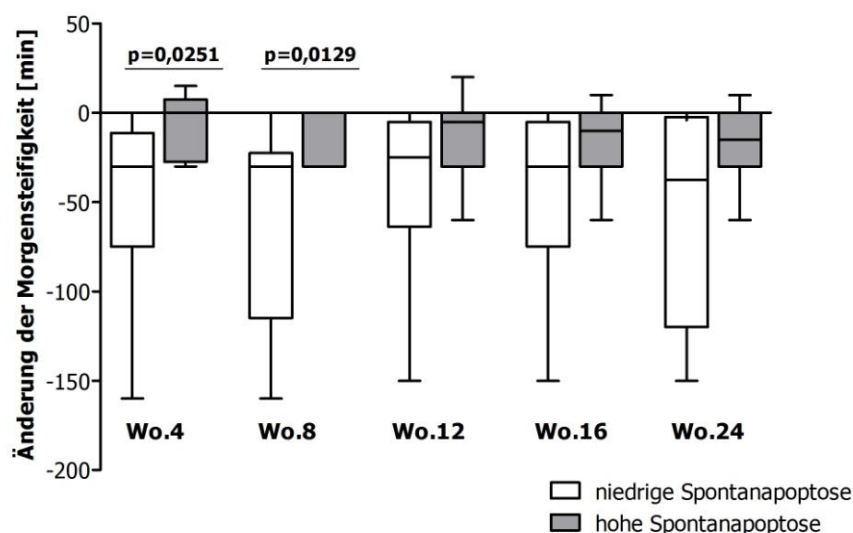


Abbildung 26: Relevanz der Spontanapoptose für die Änderung der Morgensteifigkeit unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis. Patienten mit niedriger Spontanapoptose (SpA) zu Baseline (in weiß, $n=10$) zeigen zu Woche 4 und 8 eine signifikant höhere Reduktion der Morgensteifigkeit als Patienten mit hoher SpA zu Baseline (in grau, $n=9$). Das signifikante Ergebnis wurde mit einem t-Test für ungepaarte Variablen berechnet. Dargestellt sind Whisker-Box-Plots mit Median, 25%- und 75%-Intervall, Min und Max.

Bei der Untersuchung anderer Parameter fielen nicht-signifikante Tendenzen mit der CRP-Änderung nach 12 und 16 Wochen auf, die die bisherige Tendenz unterstützen (Tab.11).

Tabelle 11: Bedeutung der Spontanapoptose (SpA) für die Vorhersage des Therapieansprechens (Response). dDAS28 = Änderung des *Disease Activity Score*; dswj = Änderung der geschwollenen Gelenke; dCRP = Änderung des C-reaktiven Proteins; dBSG = Änderung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit; dVAS = Änderung der visuellen Analogskala; dMst = Änderung der Morgensteifigkeit der Gelenke. Die fettgedruckten p-Werte sind signifikant, die anderen p-Werte stellen nicht-signifikante Tendenzen bis $p=0,2$ dar.

Parameter	Tendenz	4	8	12	16	24
		p-Wert (hohe vs. niedrige SpA)				
dDAS28	↑ SpA = ↑ Response			0,017	0,024	0,031
dswj	↑ SpA = ↑ Response		0,03	0,151		
dCRP	↑ SpA = ↑ Response			0,054	0,063	
dBSG	↔					
dVAS	↔					
dMst	↑ SpA = ↓ Response	0,03	0,019			

Relevanz der Reverse Signaling induzierten Apoptose

Die Untersuchung der RSIA hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Vorhersage der Krankheitsaktivität bzw. des Therapieansprechens ergab die folgenden Ergebnisse.

Für die BSG ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen mit niedriger und hoher RSIA zu Studienbeginn (Abb.27). Patienten mit hoher Apoptose zeigten eine signifikant höhere BSG als jene mit niedriger Apoptose zu Baseline. Dieser Unterschied ist nach Woche 12 ($p=0,0374$) und 16 ($p=0,025$) signifikant.

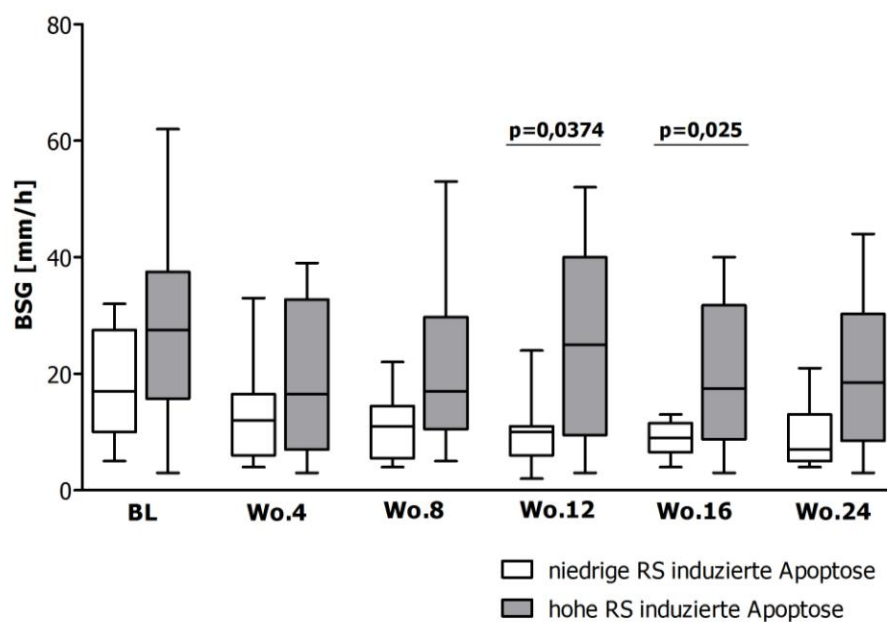


Abbildung 27: Bedeutung der RS induzierten Apoptose auf die BSG unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis. Patienten mit niedriger RSIA zu Baseline (in weiß, $n=9$) zeigten zu Woche 12 und 16 eine signifikant niedrigere BSG als Patienten mit hoher RSIA zu Baseline (in grau, $n=10$). Das signifikante Ergebnis wurde mit einem t-Test für ungepaarte Variablen berechnet. Dargestellt sind Whisker-Box-Plots mit Median, 25%- und 75%-Intervall, Min und Max.

Die Morgensteifigkeit der Patienten mit hoher RSIA war zu Baseline und in den folgenden Wochen höher als in der Gruppe mit niedriger RSIA (Abb.28). Ein signifikantes Ergebnis konnte zu BL mit $p=0,0095$ errechnet werden und gibt das Resultat der Korrelationsanalyse in Tabelle 5 wieder.

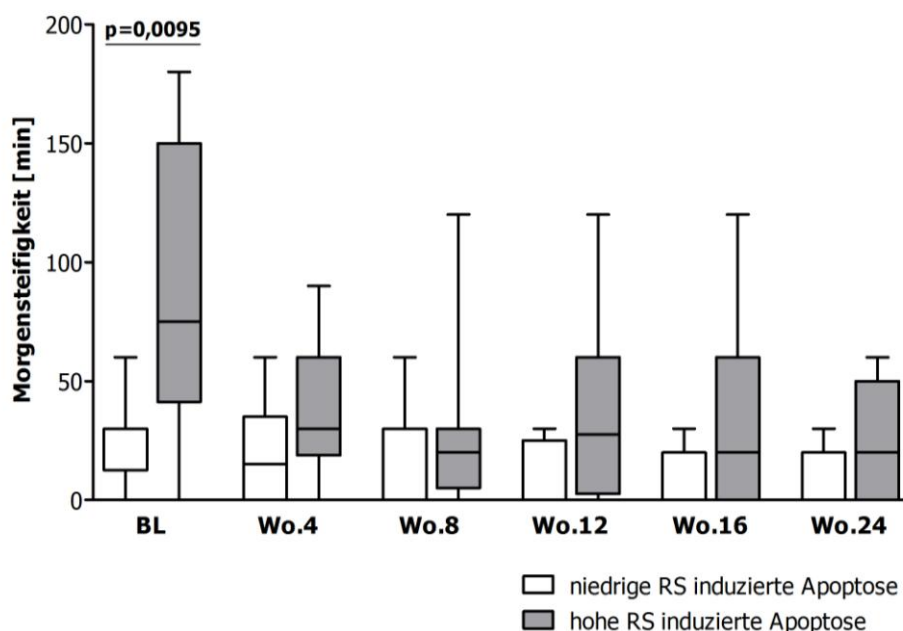


Abbildung 28: Relevanz der RS induzierten Apoptose auf die Morgensteifigkeit (Mst) unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis. Patienten mit niedriger RSIA zu Studienbeginn (in weiß, n=9) zeigten zu Baseline eine signifikant niedrigere Mst als Patienten mit hoher RSIA zu Baseline (in grau, n=10). Das signifikante Ergebnis wurde mit einem t-Test für ungepaarte Variablen berechnet. Dargestellt sind Whisker-Box-Plots mit Median, 25%- und 75%-Intervall, Min und Max.

Neben der BSG und der Morgensteifigkeit zeigte die RS induzierte Apoptose mit dem DAS28 eine nicht-signifikante Tendenz (Tab.12). Andere Parameter sind nicht wegweisend.

Tabelle 12: Bedeutung der Reverse Signaling induzierten Apoptose (RSIA) für die Höhe der Krankheitsaktivität (KH-Akt.). DAS28 = *Disease Activity Score*; swj = geschwollene Gelenke; CRP = C-reaktives Protein; BSG = Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit; VAS = visuelle Analogskala; Mst = Morgensteifigkeit der Gelenke. Die fettgedruckten p-Werte sind signifikant, die anderen p-Werte stellen nicht-signifikante Tendenzen bis $p=0,2$ dar.

Parameter	Tendenz	BL	4	8	12	16	24
		p-Wert (hohe vs. niedrige RSIA)					
DAS28	RSIA ↑ = KH-Akt. ↑				0,102		0,065
swj	↔						
CRP	↔						
BSG	RSIA ↑ = KH-Akt. ↑	0,113		0,066	0,04	0,03	0,056
VAS	↔						
Mst	RSIA ↑ = KH-Akt. ↑	0,01	0,09		0,083	0,098	0,114

Bezogen auf die Änderung des DAS28 zeigte sich, dass Patienten mit einer hohen RSIA vor Therapie einen signifikant niedrigeren DAS28-Abfall aufwiesen (Abb.29). Je höher die RSIA zu Baseline war, umso weniger fiel der DAS28 unter Therapie und umso schlechter war das Ansprechen. Diese Tendenz war zu Woche 12 ($p=0,0175$), Woche 16 ($p=0,0235$) und zu Woche 24 ($p=0,0309$) signifikant.

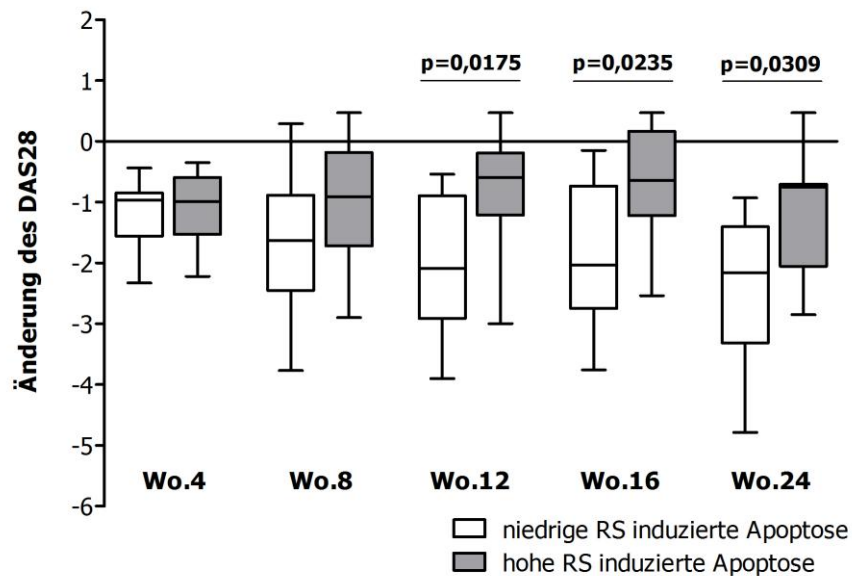


Abbildung 29: Bedeutung der RS induzierten Apoptose auf die Änderung des DAS28 unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis. Patienten mit niedriger RSIA zu Studienbeginn (in weiß, $n=9$) zeigten zu Woche 12, 16 und 24 einen signifikant höheren DAS28-Abfall als Patienten mit hoher RSIA zu Baseline (in grau, $n=10$). Das signifikante Ergebnis wurde mit einem t-Test für ungepaarte Variablen berechnet. Dargestellt sind Whisker-Box-Plots mit Median, 25%- und 75%-Intervall, Min und Max.

Es zeigte sich desweiteren ein Zusammenhang zwischen der Änderung der Morgensteifigkeit und der RSIA (Abb.30). Eine höhere Reduktion der Morgensteifigkeit wurde in der Gruppe mit hoher RSIA beobachtet. Dies war signifikant zu Woche 4 ($p=0,0295$) und 8 ($p=0,0194$).

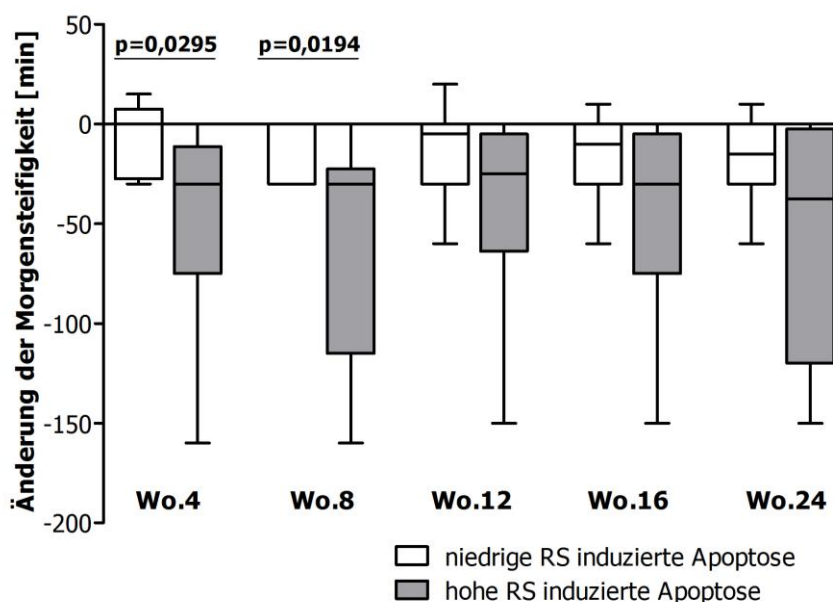


Abbildung 30: Bedeutung der RS induzierten Apoptose auf die Änderung der Morgensteifigkeit (Mst) unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis. Patienten mit niedriger RSIA zu Studienbeginn (in weiß, $n=9$) zeigten zu Woche 4 und 8 eine signifikant geringere Reduktion der Mst als Patienten mit hoher RSIA zu Baseline (in grau, $n=10$). Das signifikante Ergebnis wurde mit einem t-Test für ungepaarte Variablen berechnet. Dargestellt sind Whisker-Box-Plots mit Median, 25%- und 75%-Intervall, Min und Max.

Die Änderung des CRP und die Änderung der Anzahl der geschwollenen Gelenke zeigten ähnliche, jedoch nicht-signifikante Tendenzen (Tab.13).

Tabelle 13: Bedeutung der Reverse Signaling induzierten Apoptose (RSIA) für die Vorhersage des Therapieansprechens (Response). dDAS28 = Änderung des *Disease Activity Score*; dswj = Änderung der geschwollenen Gelenke; dCRP = Änderung des C-reaktiven Proteins; dBSG = Änderung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit; dVAS = Änderung der visuellen Analogskala; dMst = Änderung der Morgensteifigkeit der Gelenke. Die fettgedruckten p-Werte sind signifikant, die anderen p-Werte stellen nicht-signifikante Tendenzen bis $p=0,2$ dar.

Parameter	Tendenz	4	8	12	16	24
		p-Wert (hohe vs. niedrige RSIA)				
dDAS28	↑ RSIA = ↓ Response			0,018	0,024	0,031
dswj	↑ RSIA = ↓ Response		0,06	0,151		
dCRP	↑ RSIA = ↓ Response			0,094	0,114	
dBSG	↔					
dVAS	↔					
dMst	↑ RSIA = ↑ Response	0,03	0,019			

4 Diskussion

Die Rheumatoide Arthritis ist eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen und führt zu einer erosiven Gelenkzerstörung mit Deformitäten und Funktionsverlust vor allem kleiner Finger- und Fußgelenke. Im Zentrum der Immunpathogenese steht der Tumornekrosefaktor, der als proinflammatorisches Zytokin das Entzündungsgeschehen aktiv vermittelt. Seit der Entwicklung der anti-TNF-Therapie kann zielgerichtet in die Pathogenese eingegriffen werden. Ein Drittel der Patienten zeigt jedoch unter TNF-Inhibitoren ein schlechtes Ansprechen. Das Therapieansprechen vorherzusagen ist klinisch, sowie gesundheitsökonomisch von großer Wichtigkeit, jedoch bisher nicht zufriedenstellend möglich.

In der vorliegenden Studie wurde die Bedeutung der tmTNF Reverse Signaling induzierten Apoptose von Monozyten für die Vorhersage des Therapieansprechens untersucht.

4.1 Patientenkollektiv, Studiendesign und Ansprechen

Um die Ergebnisse dieser Studie zu werten, muss zunächst die Patientenkohorte bezüglich Größe und Art diskutiert werden. Mit 20 Patienten ist die Größe des Patientenkollektivs vergleichsweise gering. Eine Erklärung dafür sind die speziellen Ein- und Ausschlusskriterien, wie beispielsweise keine bisherige anti-TNF-Therapie und eine geforderte hochaktive Erkrankung. Diese Kriterien grenzen die Auswahl an passenden Patienten deutlich ein. Die Selektion geeigneter Patienten ermöglicht hingegen eine gezielte und störungsfreie Auswertung.

Die Geschlechter- und Altersverteilung stellt sich mit einem Anteil von 70% Frauen und einem Medianalter von 54 Jahren typisch für die RA dar [1, 44]. Die bisherige Dauer der Erkrankung zeigt mit 4 ± 4 Jahren eine deutliche Schwankung innerhalb der Patientenkohorte und liegt unterhalb der Krankheitsdauer in anderen Studien zur Vorhersage der anti-TNF-Therapieresponse [49, 80]. Die niedrige RA-Dauer mag auch der Tatsache geschuldet sein, dass heutzutage relativ früh im Krankheitsverlauf zu Biologika gegriffen wird und anti-TNF naive Patienten daher eine vergleichsweise kurze Erkrankungsphase haben.

Die mittlere Krankheitsaktivität der Patienten lag bei einem DAS28 von 4,76 und im Durchschnitt hatten die Patienten 8 druckschmerzhaft und 6 geschwollene Gelenke. Diese Werte stellen eine moderat aktive Erkrankung dar. Der DAS28 in anderen Studien zur Vorhersage des TNF-Therapie liegt teilweise deutlich darunter [49], darüber [51] oder im selben Bereich [50]. Es muss dabei jedoch beachtet werden, dass die Erhebung der

betroffenen Gelenke eine individuelle Durchführung des untersuchenden Rheumatologen ist. Standardisierte Gelenkuntersuchungsverfahren anzuwenden ist essentiell und sollte stets angestrebt werden [81]. Bei einem Vergleich verschiedener Studiendesigns ist dies jedoch nur eingeschränkt nachvollziehbar. Zudem ist die Berechnung der Krankheitsaktivität bzw. des DAS28 auf verschiedene Weise möglich. In dieser Studie wurde der DAS28 mit der BSG berechnet, entsprechend dem 1995 von Prevoo et al. entwickelten modifizierten DAS [12]. Weiterhin ist die Berechnung des DAS28 mit CRP oder mit nur 3 Faktoren ohne die Angabe des Patienten möglich. Dies beeinflusst die Höhe des Ergebnisses zusätzlich, wobei der DAS28-CRP beispielsweise niedriger ausfällt als der DAS28-BSG [82].

Die Dauer der Morgensteifigkeit der Gelenke (Mst) wurde von den Patienten im Durchschnitt mit $55 \pm 52,34$ Minuten zu Studienbeginn angegeben. Diese große Abweichung kann folgende Ursachen haben. Die Mst ist ein Parameter, den die Patienten subjektiv angeben. Außerdem gibt es eine Diskrepanz zwischen der Meinung des Patienten bezüglich der Morgensteifigkeit von Gelenken und der Definition der Mst des Rheumatologen. Die Bedeutung der Morgensteifigkeit für die Krankheitsaktivität wurde bereits untersucht [83, 84]. Es zeigte sich, dass die Dauer der Mst eine geringe Assoziation mit klassischen Markern für Krankheitsaktivität, wie Gelenkscore und BSG aufweist. Daher sollten diese Daten nicht zu schwer gewichtet werden.

Zur Bestimmung der Krankheitsaktivität wurden die Laborparameter CRP und BSG bestimmt. Dabei lagen die Durchschnittswerte bei CRP mit 7,22mg/l und bei der BSG mit 23,35mmHg/h nur leicht über der Normwertgrenze. Dass würde für eine niedrige Krankheitsaktivität innerhalb der Patientengruppe sprechen. Es konnten jedoch auch hohe Schwankungen beobachtet werden. Beide Parameter sind sehr sensitiv und relativ unspezifisch für rheumatologische Entzündungsgeschehen. Desweiteren können aktive Krankheitsverläufe unabhängig von hohen Entzündungswerten auftreten.

Die Häufigkeit von RF-positiven RA-Patienten wird in der Literatur mit 70-80% angegeben [23]. Damit liegen die Studienpatienten mit 65% unter diesen Angaben. Im Gegensatz dazu liegt die Patientenkohorte mit 80% anti-CCP-Antikörper positiven Patienten über den Werten, die in der Literatur gefunden wird. Dieser Befund könnte dafür sprechen, dass die Patienten in der vorliegenden Studie an schwerer RA litten, da anti-CCP-Antikörper-Positivität bei RA mit einer schweren Verlaufsform und hoher Krankheitsaktivität einhergeht [23, 85].

Ein Großteil der Patienten (95%) kombinierten Etanercept mit einem klassischen DMARD. Dabei war Mtx mit fast 75% das meist verwendete DMARD. Die hohe Wirksamkeit der Kombinationstherapie von Methotrexat und Etanercept ist bereits beschrieben [44] und wird auch von der EULAR empfohlen [36].

4.2 Therapieansprechen der Patienten

Bezüglich des Therapieansprechens anhand der EULAR-Response-Kriterien gab es in dieser Studie 10 Patienten mit gutem, 7 Patienten mit mittlerem und 2 Patienten mit schlechtem Ansprechen. Die zwei Patienten mit schlechtem Ansprechen mussten die Therapie bereits vor Ablauf der geplanten Beobachtungsdauer von 24 Wochen abbrechen. Nach Zuordnung in 2 Gruppen fanden sich unter den Studienpatienten 53% Responder und 47% Non-Responder. Als Non-Responder wurden die Patienten mit schlechtem und mittleren Ansprechen gewertet. Darin unterscheidet sich die hier vorliegende Studie von anderen Arbeiten zu diesem Thema. Hueber et al. beispielsweise bewerteten das Therapieansprechen mit Hilfe der ACR-Kriterien [80]. Hyrich et al. und Kayakabe et al. werteten das Therapieansprechen anhand der EULAR-Kriterien, wobei Hyrich et al. die Ränge gut, mittel und schlecht nutzte und Kayakabe et al. die Patienten mit gutem und mittleren Ansprechen zur Gruppe der Responder zusammenfasste [50, 51]. Diese Unterschiede erklären die hohe Zahl der Non-Responder in dieser Studie.

Die EULAR-Kriterien beziehen sich nur auf den aktuellen DAS28 und die DAS28-Reduktion verglichen mit dem Wert zu Studienbeginn [14, 86]. Dabei fallen in den Bereich für mittleres Ansprechen Patienten, die tendenziell gut bzw. schlecht angesprochen haben. Um diese genauer zu beurteilen ist eine Betrachtung von anderen Parametern nötig. Die Entscheidung, Patienten mit mittlerem Ansprechen als Non-Responder zu werten, wurde in dieser Studie anhand des Verlaufs von Einzelparametern, wie DAS28, CRP und BSG getroffen. Außerdem wurde die klinische Erfahrung des Rheumatologen und die Beobachtung der einzelnen Patientenverläufe einbezogen. Diese Einteilung stellt damit eine erhöhte Sicherheit für die Patienten dar, da mit dieser Konsequenz nur Patienten mit gutem Ansprechen auf die Therapie mit einem TNF-Inhibitor eingestellt würden. Andererseits birgt diese Zuordnung das Risiko, dass die Therapie Patienten versagt bleibt, die eventuell darauf angesprochen hätten. Betrachtet man den Verlauf der Einzelparameter unter Therapie, ist eine feinere und genauere Beurteilung des Ansprechens möglich. Dabei zeigte sich ein signifikanter Abfall aller Parameter unter Therapie, ausgenommen das CRP. Dies bestätigt zunächst die Wirksamkeit der anti-TNF-Therapie mit Etanercept. Ungewöhnlich ist, dass es unter der anti-TNF-Therapie nicht zu einem Abfall des CRP kam. Dies wurde bereits für die Therapie mit Infliximab gezeigt [87]. Der fehlende Abfall des CRP unter Therapie könnte mit den niedrigen CRP-Werten zu Studienbeginn assoziiert sein. Damit ist CRP in dieser Studie kein passender Parameter für das Therapieansprechen.

4.3 Expression von tmTNF sowie TNFR1 und TNFR2 auf RA-Monozyten

Transmembraner Tumornekrosefaktor (tmTNF) ist das Schlüsselmolekül des Reverse Signaling. Es wurde daher die tmTNF-Expression auf RA-Monozyten untersucht. Die Expressionsanalyse brachte den Nachweis von tmTNF auf den RA-Monozyten der Studienpatienten. Die tmTNF-Expression humaner Monozyten wird in der Literatur unterschiedlich angegeben. Lugering et al., Shen et al. und Meusch et al. konnten tmTNF auf unstimulierten humanen Monozyten nachweisen [42, 75, 88], wobei Meusch et al. im direkten Vergleich von RA-Patienten und gesunden Probanden eine erhöhte tmTNF-Expression auf ruhenden RA-Monozyten sahen. Andere Arbeitsgruppen beobachteten die tmTNF-Expression nur nach Stimulation der Monozyten [61, 89]. Diese Unterschiede können verschiedene Ursachen haben. Zum einen können andere Materialien und Methoden zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Zum zweiten ist die Expression von tmTNF stark von der Aktivität des TNF-converting enzyme (TACE) abhängig. Es wurde beispielsweise eine erhöhte Aktivität der TACE in Synovialgewebe von RA-Patienten gefunden [90]. Das würde jedoch für eine verminderte tmTNF-Expression bei RA-Monozyten sprechen. Ein weiterer, wichtiger Faktor in der Expressionsanalyse des tmTNF ist die falsch-positive Messung von rezeptorgebundenem TNF. In der vorliegenden Studie wurde ein Antikörper verwendet, der laut Hersteller geeignet ist tmTNF von rezeptorgebundenem sTNF zu unterscheiden [91]. Dennoch kann dies nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Die Monozyten der RA-Patienten exprimieren deutlich TNFR1 und TNFR2 auf der Zelloberfläche. Die Expression der TNFR1/2 auf RA-Monozyten konnte bereits nachgewiesen werden [65]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Rezeptoren von Zellen in RA-Synovialgewebe verstärkt exprimiert werden [92].

4.4 Spontanapoptose und RS induzierte Apoptose der RA-Monozyten

Das Reverse Signaling (RS) und die genauen Konsequenzen dieser Signaltransduktion sind noch nicht abschließend untersucht. Verschiedene Arbeiten legen die Vermutung nahe, dass RS auch an der Wirkweise von TNF-Inhibitoren beteiligt ist [40, 42, 76]. Lugering et al. zeigten, dass Infliximab zur Apoptose von Monozyten bei Patienten mit Mb. Crohn führt [42]. Catrina et al. beobachteten erhöhte Apoptose in Synovialgewebe und eine Reduktion der Monozytenzahl bei RA-Patienten nach einer Therapie mit Etanercept und Infliximab [40]. Waetzig et al. konnten Apoptose von Monozyten mittels löslichem TNFR1 via tmTNF induzieren [76]. Nicht zuletzt zeigte unsere Arbeitsgruppe, dass die Stimulation von RA-

Monozyten mit Infliximab und Etanercept Apoptose induziert und dass die Expression von tmTNF mit der Apoptoserate korreliert [75]. Desweiteren fanden Meusch et al., dass gesunde Monozyten eine höhere Spontanapoptose als RA-Monozyten aufweisen.

In diesem Patientenkollektiv wurde die Spontanapoptose (SpA) und die Reverse Signaling induzierte Apoptose (RSIA) im Durchflusszytometer mittels Annexin V und Propidiumiodid gemessen. Dabei zeigte sich eine messbare Spontanapoptose mit durchschnittlich 28,81% apoptotischen Zellen und einer großen Streubreite. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass es zwei Gruppen von RA-Patienten gibt. Eine Gruppe, in der die Monozyten eine hohe Spontanapoptose aufweisen, während die Monozyten der anderen Gruppe „RA-typisch“ eine niedrige SpA zeigen. Eine niedrige Spontanapoptose bei RA lässt sich eventuell über eine spontan erhöhte Zytokinproduktion und eine damit verbundene Autoaktivierung der Monozyten erklären. Ruschen et al. und Lioté et al. zeigten beispielsweise eine solche vermehrte Produktion proinflammatorischen Zytokinen im Vergleich zu gesunden Spendern [93, 94]. Swaak et al. hingegen zeigten eine verminderte Zytokinproduktion bei RA-Patienten [95].

Desweiteren wurde gesehen, dass die RSIA unterschiedlich ausfällt. So konnte man auch hier von einer Einteilung der RA-Monozyten in RS sensitiv und -nicht-sensitiv sprechen. Die Analyse der Befunde von SpA und RSIA ergab eine negative Korrelation bei RA-Monozyten. Das bedeutet, eine niedrige Spontanapoptose geht mit einer hohen RSIA einher.

Zusammengefasst ergibt sich das Bild, dass einige RA-Monozyten eine niedrige SpA und entsprechend eine hohe RSIA zeigen. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Meusch et al. überein [75]. Dagegen weisen jene RA-Monozyten mit hoher Spontanapoptose und niedriger RSIA gegensätzliche Merkmale auf. Nach Meusch et al. zeigten gesunde Monozyten diese Eigenschaften [75]. So könnte man zu dem Schluss kommen, dass manche RA-Monozyten ein ähnliches Verhalten gesunder Monozyten zeigen und eventuell eine andere Rolle im Entzündungsgeschehen spielen. Die Bedeutung jener Konstellation für die Vorhersage des Therapieansprechens sollte genauer untersucht werden.

4.5 Zusammenhang zwischen Krankheitsaktivität und experimentellen Parametern zu Studienbeginn

Es wurde untersucht, ob die Expression von tmTNF oder die Höhe der SpA bzw. der RSIA mit der Krankheitsaktivität korreliert. Es zeigte sich dabei nur eine Korrelation der Morgensteifigkeit mit der Spontanapoptose und der RSIA, wobei dies kritisch zu betrachten ist. Zum einen zeigt sich die Literatur zurückhaltend, was die Bedeutung der Mst für die

Krankheitsaktivität betrifft [83, 84]. Zum anderen erfolgt die Angabe der Morgensteifigkeit subjektiv. Daher könnten diese Ergebnisse dafür sprechen, dass die Höhe der experimentell erhobenen Parameter nicht mit der Krankheitsaktivität korrelieren. Die Arbeit von Wright et al. unterstützt diese These, wobei diese Gruppe keine Korrelation der tmTNF-Expression auf neutrophilen Granulozyten bei RA mit der Krankheitsaktivität zu Baseline sahen [96].

4.6 Verlauf der experimentellen Parameter unter Therapie

Dass eine anti-TNF-Therapie in das Zell- und Zytokinegleichgewicht bei RA eingreift, zeigten bereits mehrere Studien [41, 43, 65, 96, 97]. Daher untersuchten wir den Verlauf der Spontanapoptose, der RSIA und der Expression von mTNF, TNFR1 und 2 unter Therapie mit Etanercept.

Der Verlauf der Spontanapoptose zeigte in der vorliegenden Studie gewisse Besonderheiten. So verlief die SpA in RA-Monozyten, die vor Therapie eine Erhöhung aufwiesen, signifikant fallend unter Etanercept-Therapie. Umgekehrt stieg die SpA in Monozyten signifikant an, bei den zuvor eine niedrige Spontanapoptose gesehen wurde. Man könnte daher zu dem Schluss kommen, dass RA-Monozyten, die zuvor eine für RA typisch niedrige Spontanapoptose zeigen, unter Therapie auf gesundes Niveau ansteigen. Dies wird von Mangan et al. unterstützt. Sie postulierten, dass Monozyten stets einer gewissen Spontanapoptose unterliegen, die durch Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine, wie IL1- β und TNF verhindert werden kann [98]. Die Reduktion der Zytokinlevel unter anti-TNF-Therapie könnte diesen „Apoptoseschutz“ reduzieren und so die steigende SpA unter Therapie erklären. Das würde für eine wirksame Therapie sprechen. Es sind jedoch die Non-Responder, deren Monozyten einen Anstieg der SpA zeigen.

Die Verminderung der SpA bei RA-Monozyten, die zu Baseline eine erhöhte Spontanapoptose zeigten, lässt sich nur schwer erklären. Man muss dabei vor allem die Tatsache mit einbeziehen, dass es die gesunden Monozyten [75] bzw. die Monozyten ohne „Apoptoseschutz“ sind [98], die eine erhöhte SpA zeigen. Die RA-Monozyten von Patienten, die gut auf die Etanercept-Therapie angesprochen haben, zeigen initial eine hohe SpA und unter Therapie eine Reduktion. Dieses Ergebnis würde bedeuten, dass Patienten mit RA-Monozyten, die sich ähnlich gesunder Monozyten verhalten, ein besseres Therapieansprechen aufweisen. Dafür sind entsprechend weiterführende Untersuchungen bezüglich der Therapieresponse nötig.

Andere klinische Faktoren, wie bisherige RA-Therapie, Antikörperstatus oder Krankheitsaktivität haben keinen Einfluss auf den Verlauf der Spontanapoptose von RA-

Monozyten unter ETA-Therapie. Dabei sollte auch dem signifikanten Abfall der SpA bei Patienten mit niedriger Morgensteifigkeit keine große Bedeutung geschenkt werden, da die Mst einen bekannt unsicheren Parameter darstellt.

Betrachtet man den Verlauf der Reverse Signaling induzierten Apoptose unter Etanercept-Therapie fällt auch hier auf, dass hohe RSIA vermindert wird und RA-Monozyten mit niedriger RSIA einen Anstieg präsentieren. Letzteres geht mit der Arbeit von Catrina et al. konform, die eine erhöhte Apoptose von Synovialzellen nach anti-TNF-Therapie mit Etanercept und Infliximab im Vergleich zu Baseline beobachteten [40]. Außerdem zeigte diese Arbeitsgruppe, dass Responder einen höheren Apoptoseanstieg im Gegensatz zur Gruppe der Non-Responder aufwiesen. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Responder zeigten einen nicht-signifikanten Anstieg der RSIA unter Therapie. Bedenkt man die negative Korrelation zwischen SpA und RSIA, entspricht dieser Befund dem Verlauf der SpA bei Patienten mit schlechtem Therapieansprechen. Diese Ergebnisse bestätigen die Theorie, dass Patienten, deren Monozyten mit niedriger RS induzierter Apoptose und hoher Spontanapoptose einhergehen, besser auf die Therapie ansprechen.

Der Einfluss der anti-TNF-Therapie auf den Verlauf der SpA und der RSIA konnte jedoch nicht vollständig geklärt werden. Da Meusch et al. die Korrelation von der tmTNF-Expression und der Höhe der induzierten Apoptose sahen [75], ist der Expressionsverlauf von tmTNF in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung.

Hier stellt sich kein gerichteter Verlauf der tmTNF-Expression unter Therapie dar. Auch zwischen RA-Monozyten, die zu Studienbeginn eine niedrige bzw. eine RSIA zeigten, gibt es keine signifikant unterschiedlichen Verläufe.

Wright et al. untersuchten die tmTNF-Expression von neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis und gesunden Kontrollen unter anti-TNF-Therapie [96]. Sie sahen dabei einen Abfall der tmTNF-Expression auf neutrophilen Granulozyten, der nach 12 Wochen Therapiedauer signifikant war, wobei sich die Expression nach Therapie auf gesundem Niveau befand. Die Unterschiede zur vorliegenden Arbeit beruhen vor allem auf der Untersuchung verschiedener Zelltypen.

Die Rolle der TNF-Rezeptoren im TNF-System der Rheumatoiden Arthritis ist noch ungeklärt. Grell et al. zeigten, dass tmTNF mehr als löslicher TNF den TNFR2 aktivieren kann [70]. Die proinflammatorische Wirkung des löslichen TNF via TNFR1 auf nahezu allen Körperzellen über die Todesdomäne des TNFR1 ist bekannt [69]. Die autokrine Aktivierung der Monozyten über sTNF im Entzündungsgeschehen könnte ebenfalls über diese Signalkaskade laufen. Die

abfallende TNFR1-Expression auf RA-Monozyten unter Therapie würde daher für eine Reduktion der proinflammatorischen Signale sprechen.

TNFR2 zeigte unter Therapie zunächst einen signifikanten Anstieg nach 12 Wochen Therapie. Nach 24 Wochen wurde ein Abfall der Expression nahezu auf Baseline-Niveau beobachtet. Dieser Verlauf und die Bedeutung des TNFR2 für das Reverse Signaling ist unklar und bedarf weiterführenden Untersuchungen.

4.7 Vorhersage des Therapieansprechens mit Hilfe der Spontanapoptose und der RS induzierten Apoptose

Ziel der Studie war es die Reverse Signaling induzierte Apoptose der RA-Monozyten hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Vorhersage des Therapieansprechens zu untersuchen bzw. einen prädiktiven Marker hierfür zu finden.

Für die Merkmale Spontanapoptose bzw. RSIA und Ansprechen zeigte der Fisher-Exact-Test mit einem p zwischen 0,05 und 0,1 einen möglichen Zusammenhang. Aus diesem Ergebnis könnte man schließen, dass Patienten mit hoher Spontanapoptose bzw. niedriger RSIA zu Baseline besser auf die Therapie ansprechen, als die andere Gruppe der Patienten. Für die fehlende Signifikanz könnte die niedrige Patientenzahl ursächlich sein. Außerdem sind die EULAR-Kriterien und die Reduktion auf Responder und Non-Responder eine grobe Einteilung des Therapieansprechens. Daher wurde die Krankheitsaktivität und das Therapieansprechen mit Einzelparametern (DAS28, Anzahl der swj, BSG, CRP, Mst, VAS) genauer untersucht. Diese Untersuchungen lieferten signifikante Ergebnisse, die die oben genannte Tendenz bestätigen.

Bezüglich der einzelnen Parameter muss zwischen Vorhersage der Krankheitsaktivität und der Vorhersage des Therapieansprechens unterschieden werden. Zur Beurteilung der Aktivität wurde die Höhe der Parameter zu den jeweiligen Terminen gewertet. Für das Ansprechen wurde die Differenz der Einzelparameter in Bezug auf den Ausgangswert zu Baseline genutzt.

Die Aktivität der RA-Erkrankung, gemessen an der Höhe des DAS28, der BSG und der Morgensteifigkeit, war niedriger bei Patienten mit hoher SpA zu Studienbeginn. Dies war für Woche 4, 12, 16 und 24 signifikant. Nimmt man auch die nicht-signifikanten Tendenzen in die Auswertung, so konnte die SpA für alle Zeitpunkte die Krankheitsaktivität prädictieren.

Umgekehrt stellt es sich für die RSIA dar. Eine RSIA zu Studienbeginn kann eine hohe Krankheitsaktivität vorhersagen. Auch für diese Ergebnisse wurden für alle Zeitpunkte

Tendenzen oder signifikante Werte gefunden. Eine größere Patientenkohorte und weitere Untersuchungen sind nötig, um dies zu validieren.

Es fällt erneut auf, dass die Auswertung von CRP keine wegweisenden Ergebnisse liefert. Das C-reaktive Protein ist, wie bereits erwähnt, in dieser Studie kein geeigneter Parameter, da die Patienten zu Baseline keine erhöhten Werte zeigten und keine Veränderung des CRP unter Therapie gesehen werden konnte. Die Anzahl der geschwollenen Gelenke und die Angabe der Krankheitsaktivität durch den Patienten (VAS) sind nicht signifikant. Diese Tatsache kann mit dem subjektiven Charakter dieser Parameter erklärt werden. Die Bestimmung der betroffenen Gelenke ist sehr untersucherabhängig und die VAS-Angabe erfolgt durch den Patienten, wobei die Meinung zur eigenen Krankheitsaktivität individuell sehr verschieden ist.

Bezüglich der Prädiktion des Therapieansprechens konnte die Tendenz des Fisher-Exact-Tests bestätigt werden. Ein gutes Therapieansprechen wurde als große Differenz der klinischen Parameter bezogen auf das Baseline-Ergebnis gewertet. Dabei wurde beobachtet, dass eine hohe Spontanapoptose bzw. eine niedrige RSIA ein gutes Therapieansprechen bedeutet. Dies konnte mit den Parametern DAS28 und Anzahl der swj belegt werden. Das C-reaktive Protein liefert in beiden Fällen nicht-signifikante, aber tendenzielle Resultate. Für die Morgensteifigkeit zeigt sich ein gegensätzliches Bild. Der Grund hierfür kann die geringe Patientenzahl und die Morgensteifigkeit als subjektiver Parameter sein.

Insgesamt konnte man zu dem Schluss kommen, dass RA-Patienten, deren Monozyten zu Baseline eine niedrige RS induzierte bzw. eine hohe Spontanapoptose zeigen, besser auf eine Therapie mit Etanercept ansprechen. Diese RA-Monozyten sind in ihren Eigenschaften bezüglich SpA und RSIA ähnlich gesunden Monozyten [75]. Es gibt jedoch für diesen konkreten Vergleich bisher nur wenige Arbeiten. Auch die Rolle der Reverse Signaling induzierten Apoptose für die Vorhersage des Therapieansprechens wurde in der Literatur bislang nicht untersucht.

Dass Monozyten für die Vorhersage des Therapieansprechens von Bedeutung sind, wurde auch von Chara et al. bestätigt [49]. Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Vorhersage der Therapiereponse auf Adalimumab bei RA und den verschiedenen Monozytenpopulationen CD14^{high} CD16^{neg}, CD14^{high} CD16^{pos} und CD14^{low} CD16^{pos}. Sie sahen deutliche Unterschiede im Verlauf aller Monozytenpopulationen bezüglich des Ansprechens, wobei Responder niedrigere Zellzahlen als Non-Responder aufwiesen. Es konnten jedoch keine Unterschiede zu Baseline

gefunden werden und die Vorhersage des Therapieansprechens war erst nach drei Monaten möglich. Interessanterweise wurde eine erhöhte CX3CR1-Expression zu Baseline auf CD14^{high} CD16^{neg} und CD14^{high} CD16^{pos} bei Patienten mit schlechtem Ansprechen gefunden. Responder zeigten, wie auch gesunde Kontrollen eine niedrigere CX3CR1-Expression. Es zeigt sich auch hier die Tendenz, dass RA-Monozyten, die ähnlich gesunden Monozyten sind, für ein besseres Therapieansprechen stehen. Eine direkte Vergleichbarkeit der Studien ist jedoch nicht möglich, zumal bei den Patienten eine vorherige anti-TNF-Therapie nicht ausgeschlossen, sondern mit einer Latenzzeit von drei Monaten erlaubt wurde. Außerdem wurden nicht die neuen ACR-Diagnosekriterien von 2010 angewendet und der DAS28 lag zu Studienbeginn niedrig mit Werten unter 4 [49]. Somit war möglicherweise die Patientenauswahl nicht optimal.

In den Untersuchungen von Kayakabe et al. wurde gezeigt, dass Non-Responder zu Baseline eine signifikant niedrigere IL-1 β -Produktion in Vollblutkulturen (*whole blood cultures*, WBCs) aufwiesen [50]. Sie schlossen 41 Biologika-naïve Patienten in die Studie ein und untersuchten das Ansprechen auf Infliximab, Etanercept und Adalimumab einmalig nach 24 Wochen. Zu Studienbeginn wurde das Zytokinprofil der WBCs gesunder Spender als Kontrollgruppe mit den Werten der RA-Patienten verglichen. Hier wurde beobachtet, dass die Produktion von IL-1 β , TNF und IL-6 bei gesunden Spendern deutlich erhöht war [50]. Zusammenfassend kann man also sagen, dass Responder, wie auch Gesunde zu Baseline eine höhere IL-1 β -Produktion zeigten, wobei die IL-1 β -Konzentration in WBCs gesunder Spender über 20-fach höher war als bei RA-Patienten mit gutem Ansprechen. Die Studie untersuchte mehr Patienten und drei verschiedene Medikamente, jedoch war die Verteilung mit Infliximab (13), Etanercept (26) und Adalimumab (2) nicht gleichmäßig. Auch eine Beurteilung des Ansprechens zu einem Zeitpunkt nach 24 Wochen ist spät im Therapieverlauf und kann für die Patienten bereits unnötiges Leiden bedeuten.

Hyrich et al. untersuchten klinische Parameter und die bisherige Therapie hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Therapieresponse bei 2879 RA-Patienten des Biologika-Registers der Britischen Gesellschaft für Rheumatologie [51]. Dabei wurde ein schlechtes Ansprechen bei Patienten mit einem höheren HAQ-Score, bei Rauchern und Frauen gesehen. Patienten, die eine bisherige Therapie mit MTX und NSAR hatten sprachen besser an. Alter, Erkrankungsdauer und Rheumafaktoren hatten keinen Einfluss, ebenso wie die Anzahl bisheriger DMARDs [51].

Die Suche nach Markern und Diagnostika zur Vorhersage des Therapieansprechens ist sehr aktiv. Ein Grund für schlechtes Ansprechen könnte die Entwicklung von Antikörpern gegen

die TNF-Inhibitoren sein [99]. Weitere, mögliche Ansatzpunkte sind Genanalysen. Träger des Genpolymorphismus TNF-308(A) beispielsweise sprechen schlechter auf eine Therapie mit TNF-Blockern an [100]. Außerdem konnte für RA-Patienten mit Rheumafaktoren und anti-CCP-Antikörpern ein schlechteres Ansprechen gefunden werden [101].

4.8 Ausblick

Die Notwendigkeit eines Markers für die Prognose des Ansprechens auf anti-TNF-Therapie ist unstrittig. Bisher wurde jedoch kein Faktor gefunden, der bedeutsam genug war, um in der Diagnostik Einzug zu halten.

Die Apoptose der RA-Monozyten wurde bisher noch nicht hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Prädiktion des Therapieansprechens untersucht, daher konnten keine direkten Vergleiche zu anderen Studien gezogen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es weitere interessante Wege gibt, die Vorhersage des Therapieverlaufs zu untersuchen und zu ermöglichen. Dabei stehen RA-Monozyten im Vordergrund, die intensiver untersucht werden sollten. Insbesondere eine genaue Charakteristika von Zytokinprofil, Oberflächenmolekülen und Reaktionen mit anderen Immunzellen sind dabei wichtig, um diese Zellen in das Entzündungsgeschehen einzuordnen.

Da tmTNF und Reverse Signaling wichtige Elemente in der Wirkweise der anti-TNF-Inhibitoren darstellen, bedarf es weiterführenden Analysen zu diesem Modell.

Diese Arbeit konnte einen Beitrag dafür leisten, wenngleich gewisse Einschränkungen gelten. Das Ansprechen wurde nur für Etanercept bestimmt. Obwohl einige Studien die ähnliche Wirksamkeit aller anti-TNF-Inhibitoren belegen [39, 102, 103], können die Ergebnisse nicht pauschal auf andere TNF-Inhibitoren übertragen werden. Für valide Aussagen sind daher die Untersuchung mehrerer TNF-Blocker, eine größere Patientenzahl und Kontrollen nötig. Das Therapieansprechen sollte länger beobachtet werden, denn nur so kann eine langfristige Diagnostik- und Therapieempfehlung gegeben werden. Außerdem ist es wichtig, das Ansprechen auf mehreren Ebenen zu beurteilen. Analysen der Lebensqualität des Patienten in Form von Fragebögen sind eine direkte Möglichkeit die Wirkung im Alltag einzuordnen [104]. Parallel können die radiologische Beurteilung von Erosion und Entzündung Aufschluss über die Wirksamkeit der Medikamente geben [105].

5 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Untersuchung zur Vorhersagbarkeit des Therapieansprechens unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

eingereicht von:

Maria Brigitte Klingner, geb. Siegemund

angefertigt:

an der Universität Leipzig, Department für Innere Medizin, Sektion Rheumatologie

betreut von:

Prof. Dr. med. Ulf Wagner und Dr. rer. nat. Undine Meusch

April 2013

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen des Menschen. Sie ist durch einen chronischen Verlauf mit Allgemeinsymptomen und erosiven Gelenkentzündungen gekennzeichnet. Die klinischen Beschwerden reichen von Morgensteifigkeit der Gelenke bis zu deren Funktionsverlust mit Deformationen. Extraartikuläre Manifestationen, vor allem das kardiovaskuläre System betreffend, erschweren den Krankheitsverlauf und verkürzen die Lebenserwartung.

In der Pathogenese der RA steht die Synovitis, die Entzündung der Gelenkinnenhaut, im Mittelpunkt. Die Ansammlung von Lymphozyten und Monozyten in der Synovialmembran und sezernierte proinflammatorische Zytokine bewirken eine Aufrechterhaltung des Entzündungsgeschehens. Das hauptsächlich von Monozyten produzierte Zytokin Tumornekrosefaktor (TNF) spielt eine entscheidende Rolle in diesem Immunprozess. TNF stimuliert Fibroblasten zur Sezernierung destruktiver Enzyme und regt zur Produktion weiterer, proinflammatorischer Botenstoffe an. Klassischerweise wirkt TNF in seiner löslichen Form und bindet an TNF-Rezeptoren auf nahezu allen Körperzellen. Ein weiterer Wirkmechanismus ist die retrograde Signaltransduktion über membranständiges TNF (tmTNF). Die Funktion von tmTNF, als Rezeptor Signale in die tmTNF-tragende Zelle zu

vermitteln, wird als Reverse Signaling bezeichnet. Es ist bekannt, dass Reverse Signaling via tmTNF in Monozyten von RA-Patienten Apoptose auslöst und in weiteren komplexen Immunprozessen involviert ist.

Die Bedeutung von TNF für die Rheumatoide Arthritis wird nicht zuletzt dadurch unterstrichen, dass die anti-TNF-Therapie einen sehr wirksamen Therapieansatz darstellt. Die Behandlung führt bei ca. zwei Drittel der Patienten zu einer Reduktion der entzündlichen und schmerzhaften Gelenkschwellung und zu einem Sistieren der Gelenkdestruktion. Es ist jedoch bekannt, dass ein Teil der Patienten schlecht auf die Therapie anspricht. Das dadurch verzögerte Erreichen eines guten Therapieerfolgs führt zu einer Verlängerung des Leidens und zu unnötigen, zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen. Gesundheitsökonomisch ist dies ebenfalls kritisch zu sehen, da mit hohen Behandlungskosten zu rechnen ist. Eine Vorhersage des Therapieansprechens ist jedoch aktuell nicht möglich.

Ziel dieser Studie war es, einen prädiktiven Marker für das anti-TNF-Therapieansprechen bei Patienten mit RA zu finden. Dabei galt der Bedeutung des Reverse Signaling via tmTNF großes Interesse.

In der Studie wurden 20 Patienten mit Rheumatoider Arthritis vor und während einer Therapie mit dem TNF-Antagonist Etanercept insgesamt 24 Wochen betreut. Die Erhebung klinischer Daten, wie die Anzahl der druckschmerzhaften und geschwollenen Gelenke, die Einschätzung der Krankheitsaktivität durch den Patienten auf einer visuellen Analogskala (VAS) und die Untersuchung der Entzündungsaktivität mit CRP und BSG, erfolgte einmalig vor und alle vier Wochen unter Therapie. Zur Einschätzung der Krankheitsaktivität wurde der *Disease Activity Score* (DAS) genutzt. Das Therapieansprechen wurde entsprechend einer Klassifikation und der Veränderung der einzelnen klinischen Parameter im Therapieverlauf gewertet. Auf der Suche nach einem prädiktiven Faktor wurden ebenfalls einmalig vor und alle vier Wochen während der Therapie mit Etanercept laborchemische Experimente durchgeführt. Dazu wurden aus dem Blut der RA-Patienten die Monozyten mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation und einer Magnetseparation isoliert. Diese wurden hinsichtlich ihrer Expression von tmTNF sowie TNFR1 und TNFR2 nach Inkubation mit entsprechenden Antikörpern durchflusszytometrisch untersucht. Weiterhin wurden die RA-Monozyten mit Etanercept bzw. einer Negativkontrolle inkubiert. Im Anschluss wurde die Apoptose der Monozyten mittels Durchflusszytometrie und Färbung mit Propidiumiodid bzw. Annexin V quantifiziert.

Entsprechend den EULAR-Kriterien kam es bei 10 Patienten (53%) zu einem guten, bei 7 Patienten (37%) zu einem mittleren und bei 2 Patienten (10%) zu einem schlechten

Ansprechen. Aufgrund der klinischer Beurteilung erfolgte eine Einteilung in zwei Gruppen, sodass unter den Patienten 10 Responder (53%) und 9 (47%) Non-Responder waren.

Die Monozyten der RA-Patienten exprimierten tmTNF mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von $14,23 \pm 3,04$. Es wurde eine MFI für TNFR1 mit $31,84 \pm 12,99$ und für TNFR2 mit $30,02 \pm 8,9$ gemessen.

Die Inkubation der RA-Monozyten mit Etanercept bzw. mit der Negativkontrolle ergab unterschiedliche Resultate innerhalb der Patientengruppe. Dabei wurde die Apoptose der Monozyten in Spontanapoptose (Negativkontrolle) und in Reverse Signaling induzierte Apoptose eingeteilt. Vor Beginn der anti-TNF-Therapie zeigte ein Teil der Patienten eine niedrige Spontanapoptose und eine erhöhte Reverse Signaling induzierte Apoptose. Die Monozyten der anderen RA-Patienten zeigten umgekehrt eine hohe Spontanapoptose und eine niedrige Reverse Signaling induzierte Apoptose. Im Folgenden wurde der Einfluss der Etanercept-Therapie auf die Apoptose der Monozyten untersucht. Es wurde ein Anstieg der niedrigen Spontanapoptose bzw. Reverse Signaling induzierte Apoptose und ein Abfall der hohen Spontanapoptose bzw. Reverse Signaling induzierte Apoptose gesehen.

Bezieht man in die Analyse das Therapieansprechen mit ein, so ergibt sich für Responder eine initial hohe Spontanapoptose, die unter Therapie signifikant sinkt. Non-Responder hingegen haben vor Therapie eine niedrige Spontanapoptose, die unter einer Therapie mit Etanercept ansteigt. Für den Verlauf der Reverse Signaling induzierte Apoptose unter der anti-TNF-Therapie gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Therapieansprechens.

Im Fisher-Exact-Test zeigte sich eine deutliche Tendenz ($p=0,07$), dass Patienten mit niedriger Spontanapoptose bzw. hoher Reverse Signaling induzierter Apoptose zu Studienbeginn schlecht auf die Therapie ansprechen. Dieses Ergebnis konnte mit Einzelparametern verifiziert werden.

Die Studie kam zu dem Schluss, dass RA-Patienten, deren Monozyten eine niedrige Reverse Signaling induzierte Apoptose bzw. eine hohe Spontanapoptose aufwiesen, besser auf eine anti-TNF-Therapie mit Etanercept ansprachen. Dieses Ergebnis kann hilfreich für die Entwicklung einer entscheidenden Diagnostik vor Therapieeinstellung sein und leistet einen Beitrag für die Vorhersage des Therapieansprechens.

6 Literaturverzeichnis

1. **Symmons DPM.** Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2002; 16: 707–22.
2. **Lee DM, Weinblatt ME.** Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2001; 358: 903–11.
3. **Hochberg MC, Johnston SS, John AK.** The incidence and prevalence of extra-articular and systemic manifestations in a cohort of newly-diagnosed patients with rheumatoid arthritis between 1999 and 2006. *Curr Med Res Opin.* 2008; 24: 469–80.
4. **Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, et al.** The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1994; 37: 481–94.
5. **Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al.** 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010; 62: 2569–81.
6. **Scott D, Antoni C, Choy E, van Riel P.** Joint counts in routine practice. *Rheumatology.* 2003: 919–23.
7. **Mainland D.** A Seven-Day variability study of 499 patients with peripheral rheumatoid arthritis: By the cooperating clinics committee of the american rheumatism association. *Arthritis Rheum.* 1965; 8: 302–34.
8. **Fuchs HA, Brooks RH, Callahan LF, Pincus T.** A simplified twenty-eight-joint quantitative articular index in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1989; 32: 531–7.
9. **Prevoo MLL, van Riel PLCM, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, van Leeuwen MA, Kuper HH, et al.** Validity and reliability of joint indices. A longitudinal study in patients with recent onset rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 1993; 32: 589–94.
10. **Smolen JS, Breedveld FC, Eberl G, Jones I, Leeming M, Wylie GL, et al.** Validity and reliability of the twenty-eight-joint count for the assessment of rheumatoid arthritis activity. *Arthritis Rheum.* 1995; 38: 38–43.
11. **van der Heijde DM, van 't Hof MA, van Riel PL, Theunisse LA, Lubberts EW, van Leeuwen MA, et al.** Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: first step in the development of a disease activity score. *Ann Rheum Dis.* 1990; 49: 916–20.
12. **Prevoo ML, van Hof MA 't, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL.** Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995; 38: 44–8.

13. **Pinals RS, Masi AT, Larsen RA.** Preliminary criteria for clinical remission in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1981; 24: 1308–15.
14. **van Gestel AM, Prevoo ML, van Hof MA 't, van Rijswijk MH, van de Putte LB, van Riel PL.** Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Criteria. *Arthritis Rheum.* 1996; 39: 34–40.
15. **Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, et al.** Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol.* 1993; 32: 903–7.
16. **MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al.** Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 30–7.
17. **Stastny P.** Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1976; 57: 1148–57.
18. **Lanchbury JS.** The HLA association with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 1992; 10: 301–4.
19. **Wordsworth BP, Lanchbury JS, Sakkas LI, Welsh KI, Panayi GS, Bell JI.** HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86: 10049–53.
20. **Sugiyama D, Nishimura K, Tamaki K, Tsuji G, Nakazawa T, Morinobu A, et al.** Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: 70–81.
21. **Oliver JE, Silman AJ.** Risk factors for the development of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2006; 35: 169–74.
22. **Steiner G.** Auto-antibodies and autoreactive T-cells in rheumatoid arthritis: pathogenetic players and diagnostic tools. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2007; 32: 23–36.
23. **Vallbracht I.** Diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63: 1079–84.
24. **Schellekens GA, Jong BA de, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ.** Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest.* 1998; 101: 273–81.

25. **Zvaifler NJ, Boyle D, Firestein GS.** Early synovitis-synoviocytes and mononuclear cells. *Semin Arthritis Rheum.* 1994; 23: 11–6.
26. **Feldmann M, Brennan FM, Maini RN.** Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol.* 1996; 14: 397–440.
27. **Choy EH, Panayi GS.** Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med.* 2001; 344: 907–16.
28. **Gitter BD, Labus JM, Lees SL, Scheetz ME.** Characteristics of human synovial fibroblast activation by IL-1 beta and TNF alpha. *Immunology.* 1989; 66: 196–200.
29. **Campbell IK, Piccoli DS, Roberts MJ, Muirden KD, Hamilton JA.** Effects of tumor necrosis factor alpha and beta on resorption of human articular cartilage and production of plasminogen activator by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 1990; 33: 542–52.
30. **Romas E, Gillespie M, Martin T.** Involvement of receptor activator of NFkB ligand and tumor necrosis factor- α in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone.* 2002; 30: 340–6.
31. **Chu CQ, Field M, Feldmann M, Maini RN.** Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1991; 34: 1125–32.
32. **van der Kooij SM, Vries-Bouwstra JK de, Goekoop-Ruiterman YPM, Ewals JAPM, Han KH, Hazes JMW, et al.** Patient-reported outcomes in a randomized trial comparing four different treatment strategies in recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009; 61: 4–12.
33. **Karow T, Lang-Roth R.** Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden. 17th ed. Pulheim: Thomas Karow; 2009.
34. **Tian H, Cronstein BN.** Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2007; 65: 168–73.
35. **Weinblatt ME.** Efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1995; 34 Suppl 2: 43–8.
36. **Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, et al.** EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: 964–75.

37. **Smolen JS, Steiner G.** Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2: 473–88.
38. **Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, et al.** Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum.* 1993; 36: 1681–90.
39. **Aaltonen KJ, Virkki LM, Malmivaara A, Konttinen YT, Nordstrom DC, Blom M.** Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of existing TNF blocking agents in treatment of rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2012; 7: e30275.
40. **Catrina AI, Trollmo C, af Klint E, Engstrom M, Lampa J, Hermansson Y, et al.** Evidence that anti-tumor necrosis factor therapy with both etanercept and infliximab induces apoptosis in macrophages, but not lymphocytes, in rheumatoid arthritis joints: extended report. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 61–72.
41. **Tak PP, Taylor PC, Breedveld FC, Smeets TJ, Daha MR, Kluin PM, et al.** Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1996; 39: 1077–81.
42. **Lugering A, Schmidt M, Lugering N, Pauels HG, Domschke W, Kucharzik T.** Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology.* 2001; 121: 1145–57.
43. **Ulfgren AK, Andersson U, Engstrom M, Klareskog L, Maini RN, Taylor PC.** Systemic anti-tumor necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis down-regulates synovial tumor necrosis factor alpha synthesis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 2391–6.
44. **Klareskog L, van der Heijde D, Jager JP de, Gough A, Kalden J, Malaise M, et al.** Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet.* 2004; 363: 675–81.
45. **Hyrich KL, Symmons DPM, Watson KD, Silman AJ.** Comparison of the response to infliximab or etanercept monotherapy with the response to cotherapy with methotrexate or another disease-modifying antirheumatic drug in patients with rheumatoid arthritis: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 1786–94.

46. **Keystone EC.** Does anti-tumor necrosis factor-alpha therapy affect risk of serious infection and cancer in patients with rheumatoid arthritis?: a review of longterm data. *J Rheumatol.* 2011; 38: 1552–62.
47. **Furst DE.** The risk of infections with biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2010; 39: 327–46.
48. **Hyrich KL, Lunt M, Watson KD, Symmons DPM, Silman AJ.** Outcomes after switching from one anti-tumor necrosis factor α agent to a second anti-tumor necrosis factor α agent in patients with rheumatoid arthritis: Results from a large UK national cohort study. *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 13–20.
49. **Chara L, Sánchez-Atrio A, Pérez A, Cuende E, Albarrán F, Turrión A, et al.** Monocyte populations as markers of response to adalimumab plus MTX in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2012; 14: R175.
50. **Kayakabe K, Kuroiwa T, Sakurai N, Ikeuchi H, Kadiombo AT, Sakairi T, et al.** Interleukin-1 measurement in stimulated whole blood cultures is useful to predict response to anti-TNF therapies in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2012; 51: 1639–43.
51. **Hyrich KL, Watson KD, Silman AJ, Symmons DPM.** Predictors of response to anti-TNF- therapy among patients with rheumatoid arthritis: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Rheumatology.* 2006; 45: 1558–65.
52. **Mewar D, Wilson AG.** Treatment of rheumatoid arthritis with tumour necrosis factor inhibitors. *Br J Pharmacol.* 2011; 162: 785–91.
53. **Coley WB.** The Treatment of Malignant Tumors by Repeated Innoculations of Erysipelas: With a Report of Ten Original Cases. *Am J Med Sci.* 1893; 10: 487–511.
54. **Kolb WP, Granger GA.** Lymphocyte in vitro cytotoxicity: characterization of human lymphotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1968; 61: 1250–5.
55. **Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B.** An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975; 72: 3666–70.
56. **Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, et al.** Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature.* 1984; 312: 724–9.
57. **Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, et al.** Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science.* 1986; 234: 470–4.

58. **Simpson SQ, Casey LC.** Role of tumor necrosis factor in sepsis and acute lung injury. *Crit Care Clin.* 1989; 5: 27–47.
59. **Dofferhoff AS, Vellenga E, Limburg PC, van Zanten A, Mulder PO, Weits J.** Tumour necrosis factor (cachectin) and other cytokines in septic shock: a review of the literature. *Neth J Med.* 1991; 39: 45–62.
60. **Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al.** Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity.* 1995; 2: 561–72.
61. **Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD.** A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell.* 1988; 53: 45–53.
62. **Tang P, Hung M, Klostergaard J.** Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry.* 1996; 35: 8216–25.
63. **Luettig B, Decker T, Lohmann-Matthes ML.** Evidence for the existence of two forms of membrane tumor necrosis factor: an integral protein and a molecule attached to its receptor. *J Immunol.* 1989; 143: 4034–8.
64. **Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Gooding L, Kriegler M.** A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell.* 1990; 63: 251–8.
65. **Rossol M, Meusch U, Pierer M, Kaltenhauser S, Hantzschel H, Hauschildt S, et al.** Interaction between transmembrane TNF and TNFR1/2 mediates the activation of monocytes by contact with T cells. *J Immunol.* 2007; 179: 4239–48.
66. **Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, et al.** A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* 1997; 385: 729–33.
67. **Hehlgans T, Pfeffer K.** The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology.* 2005; 115: 1–20.
68. **Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV.** A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell.* 1993; 74: 845–53.
69. **Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME.** Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem.* 1998; 254: 439–59.
70. **Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, et al.** The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell.* 1995; 83: 793–802.

71. **Suzuki I, Fink PJ.** Maximal proliferation of cytotoxic T lymphocytes requires reverse signaling through Fas ligand. *J Exp Med.* 1998; 187: 123–8.
72. **Wiley SR, Goodwin RG, Smith CA.** Reverse signaling via CD30 ligand. *J Immunol.* 1996; 157: 3635–9.
73. **Eissner G, Kirchner S, Lindner H, Kolch W, Janosch P, Grell M, et al.** Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages. *J Immunol.* 2000; 164: 6193–8.
74. **Harashima S, Horiuchi T, Hatta N, Morita C, Higuchi M, Sawabe T, et al.** Outside-to-inside signal through the membrane TNF-alpha induces E-selectin (CD62E) expression on activated human CD4+ T cells. *J Immunol.* 2001; 166: 130–6.
75. **Meusch U, Rossol M, Baerwald C, Hauschildt S, Wagner U.** Outside-to-inside signaling through transmembrane tumor necrosis factor reverses pathologic interleukin-1 β production and deficient apoptosis of rheumatoid arthritis monocytes. *Arthritis Rheum.* 2009; 60: 2612–21.
76. **Waetzig GH, Rosenstiel P, Arlt A, Till A, Brautigam K, Schafer H, et al.** Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 induces apoptosis via reverse TNF signaling and autocrine transforming growth factor-beta1. *FASEB J.* 2005; 19: 91–3.
77. **Dörner K.** Klinische Chemie und Hämatologie: 69 Tabellen. 6th ed. Stuttgart ;, New York: Thieme; 2006.
78. **Schütt C, Bröker B.** Grundwissen Immunologie. 3rd ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011.
79. **Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D.** Der Experimentator: Immunologie. 3rd ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
80. **Hueber W, Tomooka BH, Batliwalla F, Li W, Monach PA, Tibshirani RJ, et al.** Blood autoantibody and cytokine profiles predict response to anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11: R76.
81. **Scott DL, Choy EH, Greeves A, Isenberg D, Kassinor D, Rankin E, et al.** Standardising joint assessment in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 1996; 15: 579–82.
82. **Matsui T, Kuga Y, Kaneko A, Nishino J, Eto Y, Chiba N, et al.** Disease Activity Score 28 (DAS28) using C-reactive protein underestimates disease activity and overestimates EULAR response criteria compared with DAS28 using erythrocyte sedimentation rate in a large observational cohort of rheumatoid arthritis patients in Japan. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66: 1221–6.

83. **Yazici Y, Pincus T, Kautiainen H, Sokka T.** Morning stiffness in patients with early rheumatoid arthritis is associated more strongly with functional disability than with joint swelling and erythrocyte sedimentation rate. *J Rheumatol.* 2004; 31: 1723–6.
84. **Khan NA, Yazici Y, Calvo-Alen J, Dadoniene J, Gossec L, Hansen TM, et al.** Reevaluation of the role of duration of morning stiffness in the assessment of rheumatoid arthritis activity. *J Rheumatol.* 2009; 36: 2435–42.
85. **Vencovský J, Macháček S, Sedová L, Kafková J, Gatterová J, Pesáková V, et al.** Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62: 427–30.
86. **Fransen J, van Riel PL.** The Disease Activity Score and the EULAR Response Criteria. *Rheum Dis Clin North Am.* 2009; 35: 745–57.
87. **Takeuchi T, Nakanishi T, Tabushi Y, Hata A, Shoda T, Kotani T, et al.** Serum protein profile of rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy (infliximab). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 855: 66–70.
88. **Shen C, Assche GV, Colpaert S, Maerten P, Geboes K, Rutgeerts P, et al.** Adalimumab induces apoptosis of human monocytes: a comparative study with infliximab and etanercept. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005; 21: 251–8.
89. **Decker T, Lohmann-Matthes ML, Gifford GE.** Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. *J Immunol.* 1987; 138: 957–62.
90. **Ohta S, Harigai M, Tanaka M, Kawaguchi Y, Sugiura T, Takagi K, et al.** Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) converting enzyme contributes to production of TNF-alpha in synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2001; 28: 1756–63.
91. Tumor Necrosis Factor cytokine hycult biotech | Hycult Biotech. <http://www.hycultbiotech.com/tnf-tnf-r-antibodies-fitc-conjugated-monoclonal-antibody-to-human-tumor-necrosis-factor-alpha-tnf-alpha-clone-t1-p11113-html> (zuletzt überprüft am 24. April 2013).
92. **Deleuran BW, Chu CQ, Field M, Brennan FM, Mitchell T, Feldmann M, et al.** Localization of tumor necrosis factor receptors in the synovial tissue and cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. Implications for local actions of tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum.* 1992; 35: 1170–8.
93. **Ruschen S, Stellberg W, Warnatz H.** Kinetics of cytokine secretion by mononuclear cells of the blood from rheumatoid arthritis patients are different from those of healthy controls. *Clin Exp Immunol.* 1992; 89: 32–7.

94. **Lioté F, Boval-Boizard B, Weill D, Kuntz D, Wautier JL.** Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: increased monocyte adhesiveness, integrin expression, and cytokine release. *Clin Exp Immunol.* 1996; 106: 13–9.
95. **Swaak AJ, van den Brink HG, Aarden LA.** Cytokine production in whole blood cell cultures of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1997; 56: 693–5.
96. **Wright HL, Chikura B, Bucknall RC, Moots RJ, Edwards SW.** Changes in expression of membrane TNF, NF- B activation and neutrophil apoptosis during active and resolved inflammation. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70: 537–43.
97. **Charles P, Elliott MJ, Davis D, Potter A, Kalden JR, Antoni C, et al.** Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF-alpha therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 1999; 163: 1521–8.
98. **Mangan DF, Wahl SM.** Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines. *J Immunol.* 1991; 147: 3408–12.
99. **Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, Stapel S, Lems WF, Aarden L, et al.** Anti-infliximab and anti-adalimumab antibodies in relation to response to adalimumab in infliximab switchers and anti-tumour necrosis factor naive patients: a cohort study. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: 817–21.
100. **O'Rielly DD, Roslin NM, Beyene J, Pope A, Rahman P.** TNF-alpha-308 G/A polymorphism and responsiveness to TNF-alpha blockade therapy in moderate to severe rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics J.* 2009; 9: 161–7.
101. **Potter C, Hyrich KL, Tracey A, Lunt M, Plant D, Symmons DPM, et al.** Association of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide positivity, but not carriage of shared epitope or PTPN22 susceptibility variants, with anti-tumour necrosis factor response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68: 69–74.
102. **Alonso-Ruiz A, Pijoan JI, Ansuategui E, Urkaregi A, Calabozo M, Quintana A.** Tumor necrosis factor alpha drugs in rheumatoid arthritis: systematic review and metaanalysis of efficacy and safety. *BMC Musculoskelet Disord.* 2008; 9: 52.
103. **Hochberg MC, Tracy JK, Hawkins-Holt M, Flores RH.** Comparison of the efficacy of the tumour necrosis factor alpha blocking agents adalimumab, etanercept, and infliximab when added to methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62 Suppl 2: ii13-6.

104. **Linde L, Sorensen J, Ostergaard M, Horslev-Petersen K, Hetland ML.** Health-related quality of life: validity, reliability, and responsiveness of SF-36, 15D, EQ-5D corrected RAQoL, and HAQ in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2008; 35: 1528–37.
105. **Hodgson RJ, O'Connor P, Moots R.** MRI of rheumatoid arthritis image quantitation for the assessment of disease activity, progression and response to therapy. *Rheumatology (Oxford).* 2008; 47: 13–21.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gelenkmännchen mit Darstellung der zu untersuchenden Gelenke.	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Reverse Signaling.	11
Abbildung 3: Studienplan zum Ablauf der Studie.	15
Abbildung 4: Verlauf der klinischen Parameter unter Etanercept-Therapie (n=19).	29
Abbildung 5: Expression von tmTNF auf RA-Monozyten der Patientenkohorte zu Studienbeginn (n=20).	30
Abbildung 6: Expression von TNFR1 auf RA-Monozyten der Patientenkohorte zu Studienbeginn (n=20).	30
Abbildung 7: Expression von TNFR2 auf Monozyten der Patientenkohorte zu Studienbeginn (n=20).	31
Abbildung 8: SpA und RSIA von RA-Monozyten.	32
Abbildung 9: SpA und RSIA von Monozyten der Patientenkohorte zu Studienbeginn.	33
Abbildung 10: Gruppeneinteilung der Monozyten von RA-Patienten anhand niedriger (n=10) und hoher (n=10) Spontanapoptose zu Studienbeginn.	34
Abbildung 11: Korrelationsanalyse von Spontanapoptose und RS induzierter Apoptose von RA-Monozyten (n=20).	35
Abbildung 12: Korrelationsanalyse von Morgensteifigkeit und Spontanapoptose (12A) bzw. RS induzierte Apoptose (12B) zu Studienbeginn (n=20).	37
Abbildung 13: Verlauf der SpA von RA-Monozyten unter Etanercept-Therapie in den Gruppen mit niedriger (n=10) und hoher (n=9) SpA zu Studienbeginn.	38
Abbildung 14: Verlauf der RS induzierten Apoptose von RA-Monozyten unter anti-TNF-Therapie mit Etanercept in den Gruppen mit initial niedriger (n=9) und hoher (n=10) RS induzierter Apoptose.	39
Abbildung 15: Verlauf der Spontanapoptose unter Etanercept-Therapie bei RA-Patienten mit gutem (n=10) und schlechtem (n=9) Ansprechen auf die anti-TNF-Therapie mit Etanercept.	40
Abbildung 16: Verlauf der Spontanapoptose unter Etanercept-Therapie bei RA-Patienten mit hoher (n=9) und niedriger (n=10) Morgensteifigkeit (Mst).	41

Abbildung 17: Verlauf der RS induzierten Apoptose unter Etanercept-Therapie bei RA-Patienten mit niedriger (n=10) und hoher (n=9) Morgensteifigkeit (Mst).....	43
Abbildung 18: Verlauf der tmTNF-Expression von RA-Monozyten unter Etanercept-Therapie (n=19).	45
Abbildung 19: Verlauf der tmTNF-Expression unter Therapie mit Etanercept bei Patienten mit niedriger (n=9) bzw. hoher (n=10) RS induzierter Apoptose.....	45
Abbildung 20: Verlauf der TNFR1-Expression unter Etanercept-Therapie bei Patienten mit RA (n=19).....	46
Abbildung 21: Verlauf der TNFR2-Expression unter Etanercept-Therapie bei Patienten mit RA (n=19).....	46
Abbildung 22: Bedeutung der Spontanapoptose für den Verlauf der BSG unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit RA.	48
Abbildung 23: Bedeutung der SpA für die Änderung des C-reaktiven Proteins unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit RA.	49
Abbildung 24: Relevanz der Spontanapoptose für die Änderung des DAS28 unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit RA.....	50
Abbildung 25: Bedeutung der Spontanapoptose für die Änderung der Anzahl der geschwollenen Gelenke unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit RA.	51
Abbildung 26: Relevanz der Spontanapoptose für die Änderung der Morgensteifigkeit unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis.....	52
Abbildung 27: Bedeutung der RS induzierten Apoptose auf die BSG unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis.....	53
Abbildung 28: Relevanz der RS induzierten Apoptose auf die Morgensteifigkeit (Mst) unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis.....	54
Abbildung 29: Bedeutung der RS induzierten Apoptose auf die Änderung des DAS28 unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis.....	55
Abbildung 30: Bedeutung der RS induzierten Apoptose auf die Änderung der Morgensteifigkeit (Mst) unter anti-TNF-Therapie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis. .	56

8 Tabellen- und Formelverzeichnis

Tabelle 1: Die ACR/EULAR-Klassifikationskriterien für die Diagnose der Rheumatoiden Arthritis von 2010.....	2
Tabelle 2: EULAR-Response-Kriterien	5
Tabelle 3: Deskriptive Statistik des Patientenkollektivs (n=20).....	26
Tabelle 4: Zuordnung des Therapieansprechens zu den Gruppen Responder und Non-Responder.	28
Tabelle 5: Korrelationsanalysen der klinischen mit den experimentellen Parametern zu Studienbeginn (n=20).....	36
Tabelle 6: Einfluss verschiedener Faktoren auf den Verlauf der Spontanapoptose unter anti-TNF-Therapie mit Etanercept.	42
Tabelle 7: Einfluss verschiedener Faktoren auf den Verlauf der RSIA unter Therapie mit Etanercept.	44
Tabelle 8: Kreuztabelle - Responder und Non-Responder der Etanercept-Therapie und die Zuordnung zu den Gruppen der Spontanapoptose.....	47
Tabelle 9: Kreuztabelle - Responder und Non-Responder der Etanercept-Therapie und die Zuordnung zu den Gruppen der RSIA.....	47
Tabelle 10: Bedeutung der Spontanapoptose (SpA) für die Höhe der Krankheitsaktivität (KH-Akt.).....	48
Tabelle 11: Bedeutung der Spontanapoptose (SpA) für die Vorhersage des Therapieansprechens (Response).	52
Tabelle 12: Bedeutung der Reverse Signaling induzierten Apoptose (RSIA) für die Höhe der Krankheitsaktivität (KH-Akt.).....	54
Tabelle 13: Bedeutung der Reverse Signaling induzierten Apoptose (RSIA) für die Vorhersage des Therapieansprechens (Response).	56
Formel 1: Berechnung des DAS28, modifiziert nach [12].....	4

9 Eigenständigkeitserklärung

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Leipzig, 26.04.2013

Unterschrift